IMMUNCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ATP-SYNTHETASE VON *ESCHERICHIA COLI* K 12

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Gerhard Bienhaus

aus Weinheim an der Bergstraße

1980

IMMUNCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ATP-SYNTHETASE VON *ESCHERICHIA COLI* K 12

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Gerhard Bienhaus

aus Weinheim an der Bergstraße

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Oktober 1980

Dekan: Prof. Dr. E. Reinhard

Erster Berichterstatter : Prof. Dr. P. Overath
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. D. Mecke

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 1978 bis Juni 1980 am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen angefertigt.

Herrn Dr. G. Vogel und Herrn Prof. Dr. P. Overath danke ich für Themenstellung und Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Bei Herrn Dr. H.U. Schairer und Herrn Dr. P. Friedl möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und insbesondere für die Übersendung von unc Mutanten und Antiseren bedanken.

Herrn Dr. H. Schwarz und Frau B. Breidenbend bin ich für die Hilfe bei der Auswertung des photographischen Materials zu Dank verpflichtet.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und der Max-Planck-Gesellschaft für die finanzielle Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	Einleitung	1
2	Ergebnisse	8
2.1	Immunchemische Charakterisierung der F_1-ATPase	8
2.1.1	Gewinnung von Antiseren gegen die einzelnen F_1-Untereinheiten	8
2.1.1.1	Isolation der Antigene	8
2.1.1.2	Charakterisierung der Antiseren	9
2.1.2	Serologische Untersuchung der nativen F_1-ATPase mit Antikörpern gegen die denaturierten Untereinheiten	13
2.1.2.1	Doppeldiffusionsexperimente mit nativer F_1-ATPase	13
2.1.2.2	Doppeldiffusionsexperimente mit einem Subkomplex der F_1-ATPase	15
2.1.3	Antikörperbindung und ATPase-Aktivität	16
2.1.3.1	Wirkung von IgG auf die ATPase-Aktivität	16
2.1.3.2	Wirkung von F_{ab} auf die ATPase-Aktivität	18
2.1.4	Die ε Untereinheit als ATPase-Inhibitor	18
2.1.4.1	Zur Stimulierung der F_1-ATPase durch Anti ε F_{ab}	19
2.1.4.2	Dissoziiert die ε Untereinheit nach Antikörperbindung von der F_1-ATPase ?	21
2.1.4.3	Wirkung von Anti ε F_{ab} auf membrangebundene F_1-ATPase	21
2.1.5	Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse	23

Seite

2.2 Anordnung der unc Gene auf dem E.coli Chromosom 27

2.2.1 Charakterisierung von Mu-induzierten unc Mutanten mit einem Radioimmunoassay 30

2.2.2 Nachweis von ATP-Synthetase Untereinheiten in unc Mutanten mit einer Immun-Replika-Technik 33

2.2.2.1 Nachweis der F_1-Untereinheiten 34

2.2.2.2 Nachweis der F_o-Untereinheiten 37

2.2.3 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse 40

2.3 Die b Untereinheit ist Bestandteil des Protonenkanals 44

2.3.1 Messung der Protonenpermeabilität mit K^+-beladenen Membranvesikeln des Wildtyps und der unc Mutante AS 12 45

3 Diskussion 47

3.1 Die F_1- ATPase 47

3.2 Der F_o- Teil der ATP-Synthetase 50

3.3 Anordnung der unc Gene 51

3.4 Biosynthese und Montage der ATP-Synthetase von E.coli 52

4 Abstract 55

5 Material und Methoden 56

5.1 Abkürzungen 56

5.1.1 Genetische Symbole 56

5.1.2 Sonstige Abkürzungen 56

5.2 Bakterienstämme 57

5.3 Chemikalien und Enzyme 57

Seite

5.4 Nährmedien 58

5.5 Geräte 59

5.6 Messung der ATPase-Aktivität 59

5.7 Fluorimetrische Bestimmungen 60
5.7.1 ATP-abhängige Fluoreszenslöschung von ACMA in Membranvesikeln 60
5.7.2 Messung der Protonenpermeabilität von Membranvesikeln 60

5.8 Isolierung der F_1-ATPase 61

5.9 Reversible Spaltung der F_1-ATPase und Isolierung von nativen Subkomplexen 63

5.10 Isolierung der F_1-ATPase Untereinheiten durch SDS-Gelelektrophorese in präparativem Maßstab 63

5.11 Antikörper 65
5.11.1 Gewinnung von Antiseren 65
5.11.2 Isolierung von Immunglobulin G 65
5.11.3 Papainspaltung von IgG und Isolierung von F_{ab} 66
5.11.4 Isolierung von spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen F_1-Untereinheiten durch Immunadsorbtionschromatographie an immobilisierter F_1-ATPase 66
5.11.4.1 Kopplung von F_1-ATPase an BrCN-aktivierte Sepharose 66
5.11.4.2 Immunadsorbtionschromatographie an immobilisierter F_1-ATPase 67
5.11.5 Radiojodierung von IgG 68

5.12 Immunchemische Methoden 68
5.12.1 Doppeldiffusionsexperimente 68
5.12.2 Nachweis von ATP-Synthetase Untereinheiten in einzelnen Zellkolonien 69

		Seite
5.12.3	Immun-Replika-Techniken	69
5.12.3.1	Zellextrakte für die Immun-Replika-Analyse	70
5.12.3.2	Replika-Techniken mit Agarose-Immuno-Gelen	70
5.12.3.3	Immun-Replika-Technik mit Hilfe von Zellulosenitratfolien	75
5.13	Polyacrylamidgelelektrophorese	76
5.14	Proteinbestimmung	78
6	Literaturverzeichnis	79

1 Einleitung

In allen Zellen wird chemische Energie in Form von ATP gespeichert und steht so biologisch unmittelbar nutzbar für energieverbrauchende Prozesse wie biosynthetische Reaktionen, Stofftransport, Muskelkontraktion, Zellteilung usw. zur Verfügung.
Es gibt zwei Möglichkeiten, um die bei der Oxidation von Substraten freiwerdende Energie zur Bildung von ATP zu nutzen: Substratkettenphosphorylierung und oxidative Phosphorylierung.
Bei der Substratkettenphosphorylierung werden energiereiche chemische Zwischenstufen gebildet, deren aktivierte Phosphatgruppe enzymatisch auf ADP übertragen werden kann. Bei der oxidativen Phosphorylierung wird freie Energie in Form eines elektrochemischen Potentials über die Membran gespeichert und kann durch eine membrangebundene ATP-Synthetase direkt zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat genutzt werden.

Pflanzen und einige Bakterien können Lichtenergie im Prozeß der Photophosphorylierung zur Bildung von ATP nutzen. Dieser Prozeß ist mit der oxidativen Phosphorylierung eng verwandt und der letzte Schritt, die ATP-Synthese, wird ebenfalls durch einen membrangebundenen ATP-Synthetase-Komplex katalysiert. Dieser Enzymkomplex befindet sich bei eukaryotischen Zellen in der Mitochondrien- oder Chloroplastenmembran, bei fast allen prokaryotischen Zellen in der Plasmamembran. Alle ATP-Synthetasen zeigen ähnlichen Aufbau und gleiche katalytische Eigenschaften. Sie bestehen alle aus einem membranperipheren F_1-Teil und einem membranintegrierten F_0-Teil. Der F_1-Teil läßt sich von der Membran ablösen, verhält sich dann wie ein wasserlösliches Protein und enthält fünf verschiedene Untereinheiten ([59],[60])

Die bei den Reaktionen der Atmungskette freiwerdende Energie wird zunächst in einem "energiereichen Zustand" der Membran gespeichert und dann von ATP-Synthetasen zur Bildung von ATP benutzt ([32]). Bei anaerobem Wachstum arbeiten bakterielle ATP-Synthetasen auch umgekehrt als ATPasen und erhalten durch Spaltung von ATP den "energiereichen Zustand" der Membran für andere energieabhängige Prozesse wie den aktiven Transport von Ionen oder Metaboliten aufrecht (vgl. Abb. 1) ([65]). In diesem Fall wird das benötigte ATP durch Substratkettenphosphorylierung gebildet.
Der molekulare Mechanismus der Energieübertragung ist trotz intensiver Bemühung seit fast 30 Jahren noch immer nicht geklärt. Am besten werden alle experimentellen Befunde durch die chemiosmotische Theorie von Mitchell erklärt ([48]). Danach entspricht dem "energiereichen Zustand" der Membran ein Protonengradient (ΔpH) und/oder eine Potentialdifferenz ($\Delta\Psi$) über die Membran. Beide üben auf Protonen eine Kraft (proton-motive-force = pmf) aus, für deren Größe gilt:

$$pmf = \Delta\Psi - Z\,\Delta pH$$

$$Z = 2{,}3RT/F$$

Energieliefernde Reaktionen, die durch membrangebundene Enzyme katalysiert werden, sind mit einer Protonen- oder Ladungsbewegung über die Membran verbunden, die die pmf aufbaut. Ladungsausgleich bzw. Protonenfluß in Gegenrichtung treibt energieverbrauchende Prozesse (vgl. Abb. 1). Diese Kopplung zwischen osmotischem Fluß und chemischen Reaktionen wird Chemiosmose genannt. Mit verschiedenen Verfahren lassen sich Membranvesikel aus ganzen Zellen isolieren, mit denen man energieabhängige Prozesse untersuchen kann ([43],[66]). Es konnte in Einklang mit der chemiosmotischen Theorie gezeigt werden, daß energieabhängige Prozesse an die Gegenwart eines geschlossenen vesikulären Membransystems gebunden sind ([32]). Bei protonenpermeablen Membranvesikeln bricht der Protonengradient und somit die Energieübertragung

zusammen. Dies kann durch Zusatz von lipidlöslichen schwachen Säuren und Basen, sogenannten Entkopplern, auch künstlich herbeigeführt werden (vgl. Abb. 1).

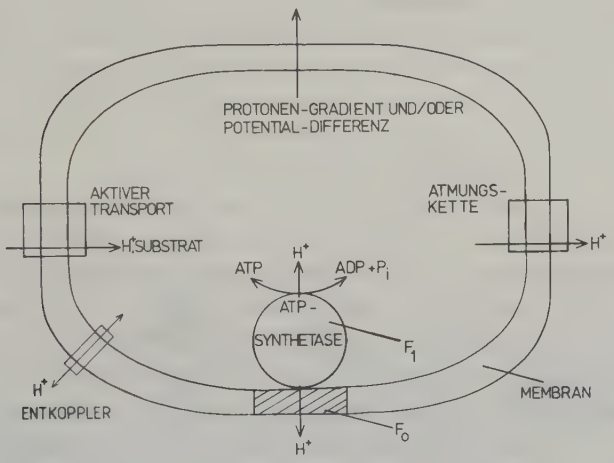

Abb. 1 Energieabhängige Prozesse in einem vesikulären Membransystem nach der chemiosmotischen Theorie ([48]).

Der Mechanismus der Kopplung von ATP-Synthese und osmotischem Fluß ist bei den ATP-Synthetasen bisher weitgehend unverstanden. Zur Aufklärung vieler Enzymmechanismen auf molekularer Basis hat neben der biochemischen Charakterisierung des Wildtyp-Enzyms die Analyse von veränderten Mutanten-Enzymen entscheidend beigetragen. Als Modellsystem für die Untersuchung von ATP-Synthetasen bietet sich die des Bakteriums E.coli an, da dieser Organismus einer Kombination von biochemischen und genetischen Methoden zugänglich ist: Einerseits ist die Genetik von E.coli hochentwickelt, andererseits steht genügend Material für biochemische Untersuchungen zur Verfügung.

Der F_1-Teil der ATP-Synthetase von E.coli läßt sich unter schonenden Bedingungen reversibel von der Membran ablösen und isolieren ([6,28,80]). Er besitzt ATPase-Aktivität und wird deshalb auch membrangebundene ATPase, F_1-ATPase oder, zur Unterscheidung von anderen Enzymen mit ATPase-Aktivität protonentranslozierende ATPase (H^+-ATPase) genannt ([39]). Das gereinigte Enzym ist als Kopplungsfaktor aktiv: Es vermag wieder an F_1-ATPase freie Membranvesikel zu binden und energieabhängige Prozesse zu rekonstituieren.
Die F_1-ATPase (MW 340 000) besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten (α, β, γ, δ, ε), die sich in nativer Form isolieren lassen ([80,19]). Keine dieser Untereinheiten zeigt ATPase-Aktivität. Zur Rekonstitution eines hydrolytisch aktiven Enzyms sind die α, β und γ Untereinheiten notwendig, während die δ und ε Untereinheiten eine Rolle bei der Bindung der F_1-ATPase an den F_o-Teil spielen ([71,77]).

Nach Ablösen der F_1-ATPase zeigen Membranvesikel eine erhöhte Protonenpermeabilität; vermutlich stellt der zurückbleibende F_o-Teil einen Protonenkanal durch die Membran dar, der durch erneute Bindung von F_1-ATPase wieder geschlossen werden kann ([1,55,63]).

Am Beispiel der ATP-Synthetase des thermophilen Bakteriums PS 3, deren Untereinheiten sich wegen ihrer hohen Stabilität besonders einfach isolieren lassen, wurde gezeigt, daß die Bindung von γ, δ und ε Untereinheiten an den F_o-Teil ausreicht, um den Protonenkanal zu schließen ([83]).

Inzwischen konnten funktionsfähige ATP-Synthetasen aus verschiedenen Organismen isoliert werden ([23,25,38,61]). Neben den F_1-Untereinheiten konnten weitere Proteine identifiziert werden, die dem membranintegrierten F_o-Teil angehören (a,b und c Untereinheiten). Über die Struktur und Funktion dieser Untereinheiten ist bisher mit Ausnahme der c Untereinheit, die wegen ihrer Chloroformlöslichkeit auch "Lipoprotein" genannt wird ([22]), noch wenig bekannt.

Aus den bisherigen biochemischen Untersuchungen wurde folgendes Modell für den Aufbau und die Funktion der ATP-Synthetase von Kagawa vorgeschlagen (Abb. 2):

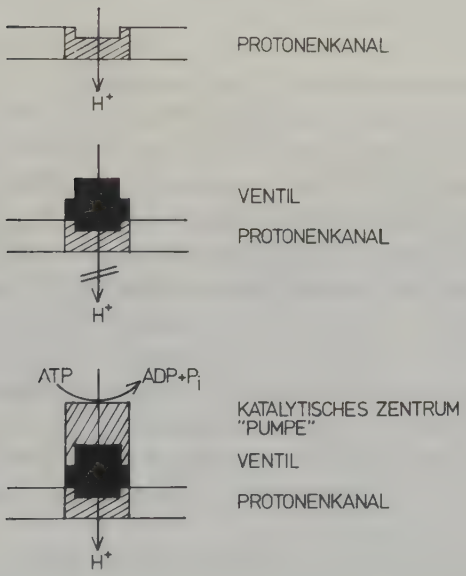

Abb. 2 Modell für den Aufbau und die Funktion der ATP-Synthetase nach Kagawa ([39]).

Der F_o-Teil wirkt als Protonenkanal, der den Protonenfluß über ein Ventil, gebildet aus γ, δ und ε Untereinheiten, mit dem reaktiven Zentrum der ATP-Synthetase koppelt. An der Katalyse selbst sind die α, β und möglicherweise auch die γ Untereinheiten beteiligt.
Der molekulare Mechanismus der Protonenleitung, sowie der der Kopplung von Protonenfluß und ATP-Synthese bleibt dabei offen.

Zur Charakterisierung der ATP-Synthetase von E.coli haben viele Untersuchungen mit genetischen Methoden beigetragen. Es wurden verschiedene Mutanten isoliert, bei denen die oxidative Phosphorylierung von der Atmungskette entkoppelt ist ([10],[65]). Diese unc⁻ Mutanten (unc = uncoupled) müssen ihren gesamten ATP Bedarf durch Substratkettenphosphorylierung decken, benötigen daher fermentierbare Substrate wie Glucose zum Wachstum und können nicht auf Substraten des Citronensäurezyklus wie Acetat, Malat oder Succinat wachsen. Diese Eigenschaft wurde zur Isolation von unc Mutanten benutzt.
Alle unc Mutanten kartieren zwischen den ilv und asn Genen bei 83 min. auf dem E.coli Chromosom ([16]).
Die bisher gefundenen unc Mutanten lassen sich grob in zwei Klassen einteilen ([65]): a) Mutanten ohne ATPase-Aktivität und b) Mutanten mit ATPase-Aktivität, die jedoch nicht zur Kopplung mit energieabhängigen Prozessen fähig ist.
Auf Grund von Komplementationsversuchen in vivo, konnten die unc Mutanten in fünf verschiedene Komplementationsgruppen (unc A, B, C, D, E) eingeteilt werden ([13],[17],[21],[29],[30]).
Durch biochemische Charakterisierung konnte gezeigt werden, daß Mutanten der Komplementationsgruppe unc A eine veränderte α Untereinheit und solche der Komplementationsgruppe unc D eine veränderte β Untereinheit besitzen ([18],[41],[69]).

Der überwiegende Teil der bisher beschriebenen unc Mutanten wurde nach Mutagenese mit ultraviolettem Licht oder nach Behandlung mit chemischen Mutagenen isoliert. Dabei können sowohl Punktmutationen als auch Deletionen unterschiedlicher Länge als Folge verschiedener Veränderungen des mutierten Gens entstehen. Als weitere Möglichkeit zur Isolation von unc Mutanten bietet sich der Mu-Phage (Mu = mutator) an ([37]). Dieser lysogene Phage kann nach Infektion einer Wirtszelle seine DNA an verschiedenen Stellen des Wirtschromosoms integrieren. Insertion in ein Strukturgen führt zu dessen Inaktivierung ([75]). Phageninsertion in Gene, die einem Operon angehören, führt zu einem hochpolaren Effekt auf alle nachfolgenden Strukturgene ([75]).
Eine genetische Manipulation der unc Gene mit dem Mu-Phagen

führte zu unc Mutanten, bei denen mehrere unc Gene inaktiviert sind ([31]). Dies wurde wiederum mit Komplementationsversuchen in vivo nachgewiesen.

Problemstellung

In der vorliegenden Dissertation sollten zunächst Antiseren gegen die Untereinheiten der F_1-ATPase gewonnen werden, mit deren Hilfe dieser Teil der ATP-Synthetase immunchemisch charakterisiert werden sollte. Danach sollten immunchemische Methoden zur Analyse von Mu-induzierten unc Mutanten angewandt werden, um zu untersuchen, welche Untereinheiten in diesen Mutanten möglicherweise fehlen. Ziel dieser Untersuchung war, die Anordnung der unc Gene auf dem Genom festzulegen.

2 Ergebnisse

2.1 Immunchemische Charakterisierung der F_1-ATPase

Die F_1-ATPase, der wasserlösliche membranperiphere Teil der ATP-Synthetase, besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten mit den Molekulargewichten :
α: 56 000, β: 52 000, γ: 31 000, δ: 21 000, ε: 11 500 ([80]).
Für die immunchemische Charakterisierung des Enzymkomplexes wurden die Untereinheiten zur Gewinnung von Antiseren isoliert.

2.1.1 Gewinnung der Antiseren gegen einzelne F_1-Untereinheiten.

2.1.1.1 Isolation der Antigene

Zur Isolation der F_1-Untereinheiten wurde die F_1-ATPase mit SDS gespalten. Durch anschließende Gelelektrophorese in präparativem Maßstab ließen sich die Antigene in homogener Form isolieren.
Schwierig war dabei die Trennung der α und β Untereinheiten, die sich nur wenig in ihren Molekulargewichten unterscheiden. Die beste Trennung wurde mit einem Polyacrylamidgradienten von 7 - 20 % erzielt.
In Abb. 3 ist das elektrophoretische Profil der F_1-ATPase und der isolierten Untereinheiten gezeigt. Im Rahmen der Nachweisgrenzen sind die zur Immunisierung verwendeten Untereinheiten rein.

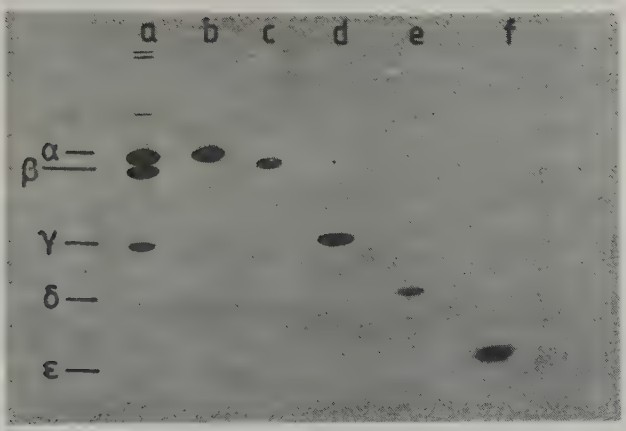

Abb. 3 Analytisches Polyacrylamidgradientengel nach Elektrophorese und Coomassie-Anfärbung.
a : F_1-ATPase (5 µg Protein)
b-f : Elektrophoretisch isolierte F_1-Untereinheiten α-ε (je 5 µg Protein)

2.1.1.2 Charakterisierung der Antiseren

Die so isolierten Antigene wurden zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Nach Gewinnung von Antiseren wurden Doppeldiffusionstests zur Titerbestimmung durchgeführt. Bei einer Verdünnung der Antiseren von 1:6 im Falle der Anti α und β Antiseren und von 1:2 bei den übrigen beobachtete man keine Präzipitationsbanden.
Aus den Antiseren wurde zunächst die IgG-Fraktion isoliert und im Doppeldiffusionstest gegen die entsprechenden elektrophoretisch isolierten Untereinheiten untersucht.

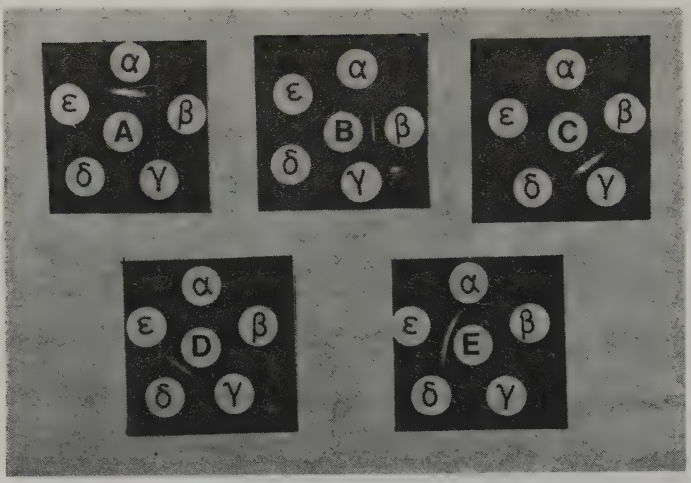

Abb. 4 Doppeldiffusionstests mit IgG und elektrophoretisch isolierten F_1-Untereinheiten.
A-E : α-ε Untereinheiten (5 µl, 1 mg/ml Protein)
α-ε : IgG gegen α-ε Untereinheiten (5 µl, 20 mg/ml IgG)

Das Ergebnis ist in Abb. 4 dargestellt. In allen Fällen beobachtet man nur eine Präzipitationsbande mit der entsprechenden Untereinheit. Kreuzreaktionen mit anderen Untereinheiten werden nicht beobachtet.
Aus diesem Ergebnis kann man schließen, daß es sich bei den in der SDS-Gelelektrophorese nachgewiesenen Peptiden tatsächlich um Untereinheiten mit verschiedener Aminosäuresequenz handelt und das nicht etwa die Untereinheiten mit kleineren Molekulargewichten lediglich proteolytische Abbauprodukte der großen Untereinheiten sind. Proteinchemisch war dies bisher nicht eindeutig nachgewiesen.

Zur weiteren Charakterisierung wurde eine Agarose-Immun-Replika-Technik angewandt ([70]). Mit dieser sehr empfindlichen Methode können die F_1-Untereinheiten nach elektrophoretischer Auftrennung in Polyacrylamidgelen direkt nachgewiesen werden. Somit ist auch ein Nachweis möglicherweise entstandener proteolytischer Bruchstücke möglich.
Nach SDS-Gelelektrophorese von F_1-ATPase werden Streifen des Polyacrylamidgels auf ein Agarose-Immuno-Gel gelegt, das bestimmte Antikörper enthält. Die Proteine diffundieren aus dem Polyacrylamidgel in das Agarosegel und präzipitieren ähnlich wie bei den Doppeldiffusionsexperimenten.
Abb. 5 zeigt einen Polyacrylamidstreifen nach Coomassie-Anfärbung und Agarose-Immuno-Gele mit verschiedenen Antikörpern, bei denen die Präzipitationsbanden jeweils durch Amidoschwarz-Anfärbung sichtbargemacht wurden.
Antiseren, die in früheren Versuchen nach Immunisierung von Kaninchen gewonnen wurden, wobei die gesamte F_1-ATPase in nativer Form als Antigen diente ([80]), enthalten überwiegend Antikörper gegen α und β Untereinheiten.
Antiseren gegen α, β, γ und δ Untereinheiten zeigen jeweils eine Präzipitationsbande und darüberhinaus im Falle der δ Polypeptidkette mehrere proteolytische Abbauprodukte mit geringeren Molekulargewichten, wovon eines mit einem Molekulargewicht von etwa 10 000 auch bei der Gelelektrophorese zu sehen ist (δ'). Bedingt durch die ähnlichen Molekulargewichte konnte dieses Abbauprodukt bei der Isolierung der ε Untereinheit nicht vollständig abgetrennt werden, so daß es in Konzentrationen unter der Erfassungsgrenze der analytischen Gelelektrophorese in Präparationen der ε Untereinheit vorhanden war, die zur Gewinnung von Antiseren eingesetzt wurden. Anti ε Antiseren enthalten deshalb auch in geringem Maße Anti δ Antikörper. Eine immunologische Verwandtschaft von beiden Untereinheiten kann ausgeschlossen werden, da Anti δ Antiseren nicht mit der ε Untereinheit reagieren (vgl. Abb. 4,5).

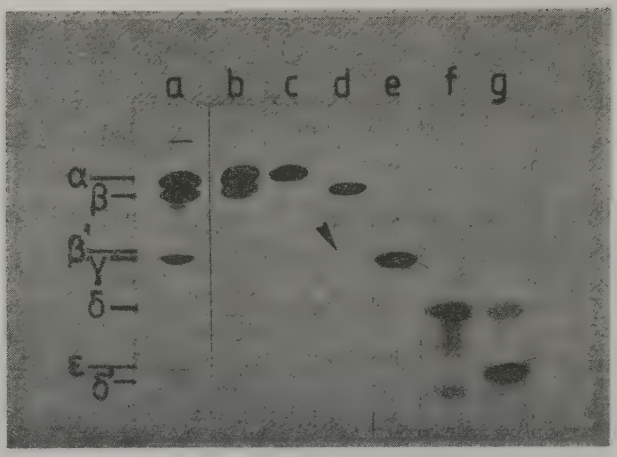

Abb. 5 Charakterisierung der Antiseren mit einer Agarose-Immun-Replika-Technik.

a : Polyacrylamidgradientengelstreifen nach Elektrophorese und Coomassie-Anfärbung von F_1-ATPase (30 µg Protein)

b-g : Agarose-Immuno-Gele mit Antikörper gegen:

b : Antiseren gegen native F_1-ATPase (freundlicherweise von G.Vogel zur Verfügung gestellt).

c-g : Antiseren gegen die F_1-Untereinheiten α-ε (vgl. 5.12.3.2)

Allerdings zeigten Antiseren, die nach mehrmaligem Booster gewonnen wurden, einen ständig wachsenden Anteil dieser Verunreinigungen, wobei auch das Anti γ Antiserum nicht mehr spezifisch reagierte und in zunehmenden Maße Anti β Antikörper enthielt. Ein proteolytisches Abbauprodukt dieser Untereinheit mit einem Molekulargewicht von etwa 30 000, das analog zum δ' Polypeptid nicht abgetrennt

werden konnte,ist in Abb.5 sehr schwach zu sehen.
Die Antiseren gegen γ und ε Untereinheiten, die nach der Erstimmunisierung gewonnen wurden,ermöglichten zwar eine immunchemische Charakterisierung der F_1-ATPase, ihre Spezifität genügte allerdings nicht für die nachfolgenden Radioimmunoassays.

2.1.2 Serologische Untersuchung der nativen F_1-ATPase mit Antikörpern gegen die denaturierten Untereinheiten

Antiseren gegen die einzelnen F_1-Untereinheiten wurden mit SDS-denaturiertem Antigen gewonnen. Solche Antiseren erkennen als antigene Determinanten im allgemeinen bestimmte Bereiche der Aminosäuresequenz und vermögen deshalb auch mit dem nativen Antigen zu reagieren ([15]).
Bisher wurden alle Untersuchungen mit SDS-denaturiertem Antigen durchgeführt. Im folgenden wird dagegen untersucht, ob die verschiedenen Antikörper auch mit nativer F_1-ATPase reagieren.

2.1.2.1 Doppeldiffusionsexperimente mit nativer F_1-ATPase

Als Nachweis dafür, daß IgG mit den Untereinheiten der nativen F_1-ATPase reagieren können, wurde die präzipitierende Wirkung der verschiedenen IgG-Präparationen in Doppeldiffusionstests untersucht.
Läßt man IgG gegen die α, β, δ und ε Untereinheiten gegen die native F_1-ATPase diffundieren, so beobachtet man Präzipitationslinien. IgG gegen die γ Untereinheit reagieren dagegen nicht (Abb. 6). Spaltet man das native Enzym

durch SDS oder Harnstoff, so erhält man auch mit diesen Antikörpern eine positive Reaktion. Doppelte oder verbreiterte Präzipitationslinien lassen sich dadurch erklären, daß der F_1-ATPase-Komplex während der Diffusion teilweise dissoziiert und dadurch sowohl ein Präzipitat gegen das gesamte Enzym, als auch eines gegen die abdissoziierte Untereinheit gebildet wird.

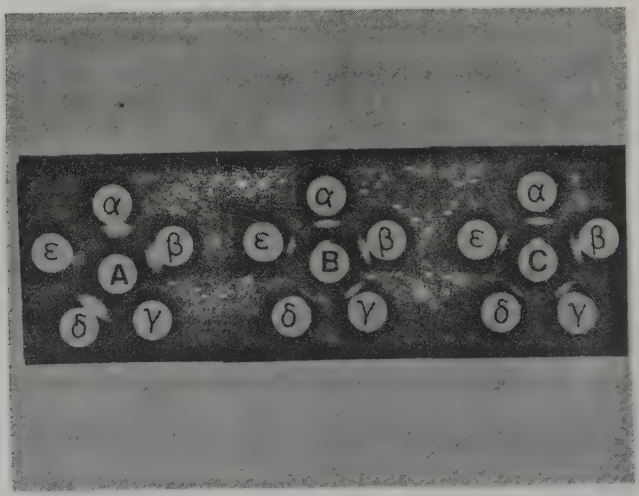

Abb. 6 Doppeldiffusionsexperimente mit F_1-ATPase und IgG gegen die denaturierten F_1-Untereinheiten.
α-ε : IgG gegen die F_1-Untereinheiten (5 µl, 20 mg/ml IgG)
A : F_1-ATPase (5 µl, 1 mg/ml Protein)
B,C : F_1-ATPase unter dissoziierenden Bedingungen (B: wie A mit 0,3 % SDS; C: wie A mit 5 M Harnstoff nach Einfrieren auf -70°C).

2.1.2.2 Doppeldiffusionsexperimente mit einem Subkomplex der F_1-ATPase

Um zu sehen, ob Anti γ IgG mit der nächst kleineren Einheit der F_1-ATPase reagieren, einem Subkomplex (MW 110 000) aufgebaut aus je einer α, γ und ε Untereinheit ([80]), wurden weitere Doppeldiffusionsexperimente durchgeführt. Der Subkomplex läßt sich nach Spaltung der F_1-ATPase isolieren ([80]). Zusammen mit einem weiteren Subkomplex, der aus der β Untereinheit besteht, läßt sich ein hydrolytisch aktiver Komplex rekonstituieren.
Das Ergebnis, in Abb. 7 dargestellt, zeigt, daß wie mit der intakten F_1-ATPase Präzipitationslinien nur unter dissoziierenden Bedingungen mit Anti γ IgG und dem Subkomplex beobachtet werden.

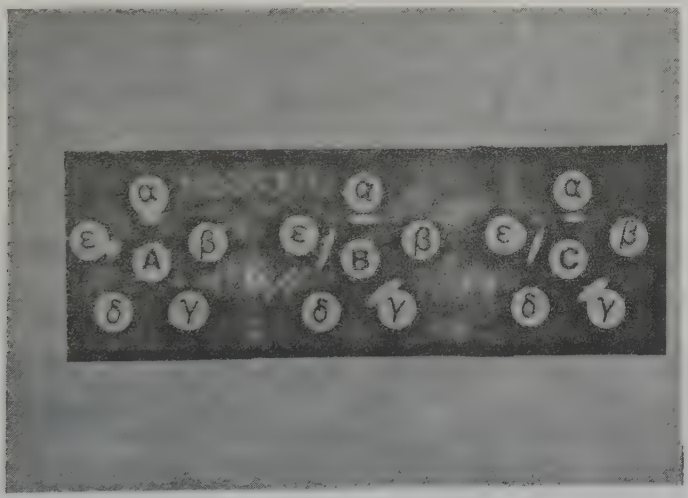

Abb. 7 Doppeldiffusionsexperimente mit einem Subkomplex aus α, γ und ε Untereinheiten und IgG gegen die F_1-Untereinheiten
α-ε : wie Abb. 6
A : Subkomplex (5 µl; 1,5 mg/ml Protein)
B,C : Subkomplex unter dissoziierenden Bedingungen wie in Abb. 6

2.1.3 Antikörperbindung und ATPase-Aktivität

Wechselwirkung zwischen Enzymen und ihren Antikörpern führt im allgemeinen zur Verringerung der Enzymaktivität. In einigen Fällen hatte die Antikörperbindung keinen Einfluß, während bei wenigen Enzymen auch eine Stimulierung der Enzymaktivität beobachtet wurde ([4]).
Untersuchung dieser Wechselwirkungen mit Hilfe von Antikörpern gegen Enzymuntereinheiten können Hinweise auf deren Funktion innerhalb des Enzymkomplexes geben.
Unter diesem Aspekt wurde im folgenden untersucht, welche Auswirkungen die Antikörperbindung an die verschiedenen Untereinheiten im nativen Enzymkomplex auf die ATPase-Aktivität haben.

2.1.3.1 Wirkung von IgG auf die ATPase-Aktivität

Um den Einfluß der IgG-Bindung an die F_1-Untereinheiten auf die ATPase-Aktivität zu untersuchen, wurde F_1-ATPase mit steigenden Mengen von IgG gegen die F_1-Untereinheiten inkubiert und anschließend die ATPase-Aktivität gemessen.
Diese Meßreihe ergab folgende Ergebnisse (Abb. 8):

a) IgG-Bindung an die α und β Untereinheiten inhibiert die ATPase-Aktivität fast vollständig.
b) Bei Inkubation mit Anti γ IgG beobachtet man eine geringe Hemmung der ATPase-Aktivität von maximal 20 %.
c) IgG-Bindung an die δ Untereinheit hat keinen Einfluß auf die Enzymaktivität.
d) Anti ε IgG stimulieren die ATPase-Aktivität etwa auf das 1,5-2 fache.

Kontrollseren zeigten jeweils einen zu vernachlässigenden Einfluß auf die ATPase-Aktivität.
Obwohl Anti γ IgG keine präzipitierende Wirkung auf die native F_1-ATPase zeigten, wurde nach Inkubation eine schwache Hemmung der Enzymaktivität beobachtet. Möglicherweise wird dieser Effekt durch die zuvor erwähnte Verunreinigung mit

Anti β Antikörper verursacht (vgl. 2.1.1.2).

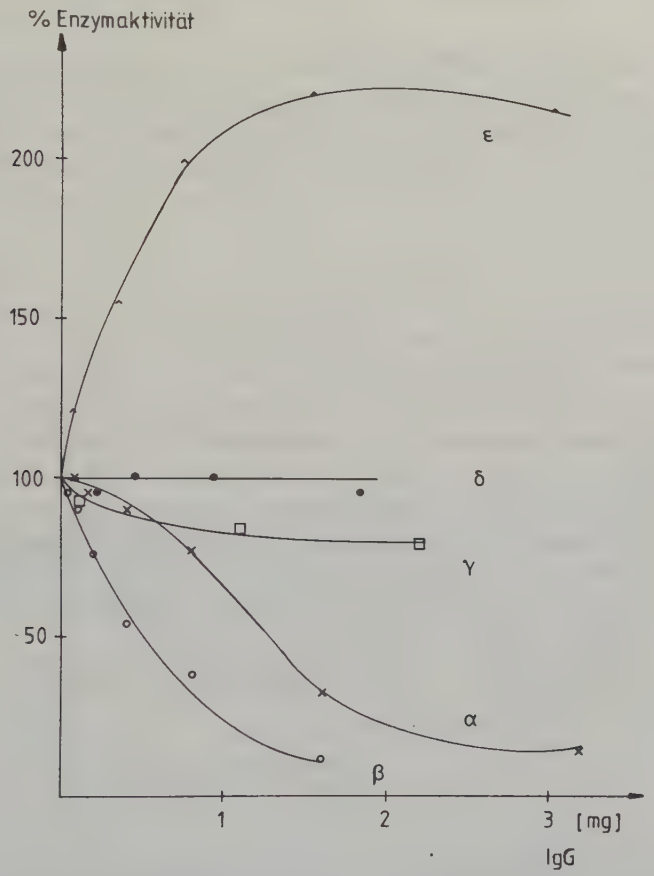

Abb. 8 Wirkung von IgG gegen die einzelnen F_1-Untereinheiten auf die ATPase-Aktivität.
50 µg F_1-ATPase (spez. Enzymaktivität 40 E/mg) wurde mit steigenden Mengen von IgG versetzt, mit Puffer auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die ATPase-Aktivität bestimmt.

2.1.3.2 Wirkung von F_{ab} auf die ATPase-Aktivität

Die zwei wesentlichen Mechanismen bei der Hemmung von Enzymen durch Antikörper werden unter den Begriffen "sterische Hinderung" und "allosterischer Effekt" zusammengefaßt ([82]). Der Effekt der sterischen Hinderung kann durch Netzwerkbildung, an der alle bivalenten Antikörper beteiligt sind, verstärkt werden.
Um solche sekundären Effekte zu berücksichtigen, wurden F_{ab}-Fragmente nach Papainspaltung von IgG isoliert. Dieses sind monovalente, nicht-präzipitierende, aber bindende Antikörper. Inkubation von F_1-ATPase mit F_{ab} gegen die einzelnen F_1-Untereinheiten zeigt deshalb nur die Wirkung der Antikörperbindung selbst auf die Enzymaktivität an.
In Abb. 9 sind die Ergebnisse dargestellt, die mit den zuvor gefundenen weitgehend übereinstimmen:

a) F_{ab} gegen die α und β Untereinheiten inhibieren die ATPase-Aktivität am stärksten.
b) F_{ab} gegen die γ und δ Untereinheiten zeigen nur wenig Einfluß auf die Enzymaktivität.
c) F_{ab} gegen die ε Untereinheit stimuliert das Enzym um das 1,5 fache.

2.1.4 Die ε Untereinheit als ATPase-Inhibitor

Die ε Untereinheit ist nach Sternweis et al. ([78]) ein ATPase-Inhibitor. Möglicherweise beeinflußt die Bindung von IgG oder F_{ab} diese Eigenschaft der ε Untereinheit und bewirkt so eine Enzymstimulierung.

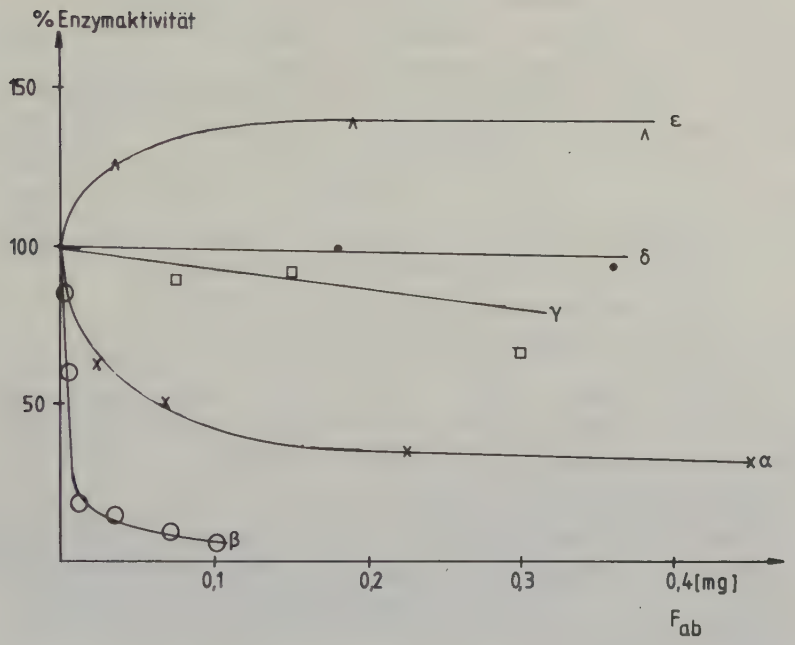

Abb. 9 Wirkung von F_{ab} gegen die einzelnen F_1-Untereinheiten auf die ATPase-Aktivität.
Diese Meßreihen wurden analog zu Abb. 8 mit steigenden Mengen von F_{ab} aufgenommen.

2.1.4.1 Zur Stimulierung der F_1-ATPase durch Anti ε F_{ab}

Um die Stimulierung der F_1-ATPase durch Anti ε F_{ab} zu studieren, wurde die ε Untereinheit nach (72) durch Pyridinbehandlung von der F_1-ATPase abgelöst und isoliert. Durch Zugabe von isolierter ε Untereinheit zu F_1-ATPase in einem molaren Verhältnis von etwa 1:250 beobachtet man eine maximale Hemmung von 52 % der ursprünglichen ATPase-Aktivität (Tab. 1 a und b).
Inkubiert man diese inaktivierte F_1-ATPase mit Anti ε F_{ab}, so wird die Enzymaktivität auf das dreifache stimuliert (Tab. 1 c)

Vergleicht man die ursprüngliche Enzymaktivität (Tab. 1 a) mit der nach F_{ab}-Inkubation (Tab. 1 c), so ergibt sich eine Stimulierung, wie sie auch nach Inkubation von F_1-ATPase mit Anti ε F_{ab} in Abb. 9 beobachtet wurde.

Tab. 1 Inhibierung der F_1-ATPase nach Inkubation mit isolierter ε Untereinheit und anschließende Stimulierung durch Inkubation mit Anti ε F_{ab}. Die ε Untereinheit wurde nach ([72]) isoliert.

	Enzymaktivität
a) F_1-ATPase 5 µg, spez. Enzymakt. 50 E/mg	100 %
b) F_1-ATPase wie a) mit isolierter ε Untereinheit (37 µg Protein)	52 %
c) F_1-ATPase mit isolierter ε Untereinheit wie b) + Anti ε F_{ab} (88 µg Protein)	157 %

Der hohe Überschuß an isolierter ε Untereinheit, der bei diesem Versuch eingesetzt werden muß, ist möglicherweise ein Zeichen dafür, daß die ε Untereinheit durch die Pyridinbehandlung teilweise denaturiert wird.

2.1.4.2 Dissoziiert die ε Untereinheit nach Antikörper-Bindung von der F_1-ATPase ?

Eine mögliche mechanistische Erklärung für die stimulierende Wirkung von Anti ε IgG oder F_{ab} wäre, daß nach Bindung dieser Proteine infolge einer Konformationsänderung die ε Polypeptidkette von der F_1-ATPase dissoziiert. Dieser Mechanismus würde mit Beobachtungen von Sternweis übereinstimmen, wonach ein Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht zwischen F_1-ATPase und der ε Untereinheit vorliegt ([78]).
Um dies zu entscheiden, wurde F_1-ATPase mit steigenden Mengen an Anti ε IgG inkubiert, die entstehenden Immunpräzipitate abgetrennt, und die ATPase-Aktivität im Überstand bestimmt. Wie Abb. 10 zeigt, wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,7-1 mg IgG pro Test die ATPase fast vollständig präzipitiert. Liegt IgG im Überschuß vor (2-4 mg IgG/Test), so werden kleinere lösliche IgG-Antigen-Komplexe gebildet. Die Stimulierung, die in diesem Fall beobachtet wird, entspricht der, die nach IgG-Inkubation direkt gemessen wurde (Abb. 8).
Dieser Versuch schließt aus, daß die ε Untereinheit durch IgG-Bindung von der F_1-ATPase dissoziiert.

2.1.4.3 Wirkung von Anti ε F_{ab} auf membrangebundene F_1-ATPase

Unter physiologischen Bedingungen ist die F_1-ATPase an den membranintegrierten F_o-Teil gebunden. In diesem Zustand vermag die isolierte ε Untereinheit nicht mehr als ATPase-Inhibitor zu wirken ([78]) und unterscheidet sich von ATPase-Inhibitoren, die bei Chloroplasten und Mitochondrien gefunden wurden ([51],[36]). Diese Peptide mit Molekulargewichten von 13 000 bzw. 15 000 hemmen sowohl die lösliche als auch die membrangebundene F_1-ATPase.

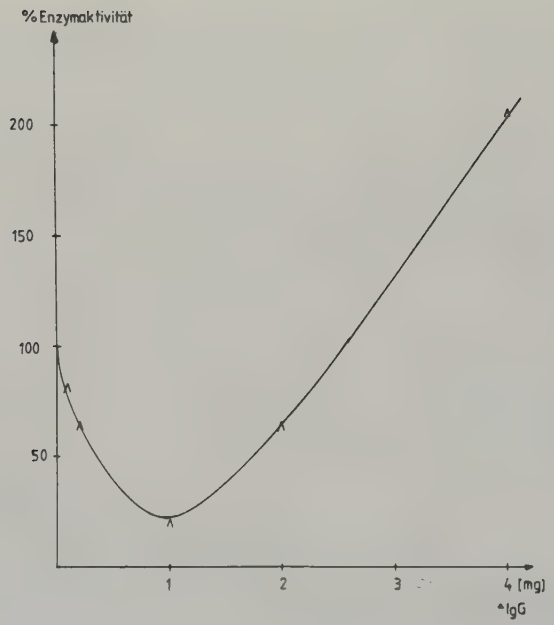

Abb. 10 ATPase-Aktivität nach Immunfällung mit Anti ε IgG. F_1-ATPase wurde wie in Abb. 8 mit Anti ε IgG inkubiert. Nach Abtrennen der Immunpräzipitate durch Zentrifugieren bei 800 g für 2 min. wurde die ATPase-Aktivität bestimmt.

Um zu untersuchen, ob eine Enzymstimulierung bei membrangebundener F_1-ATPase noch erfolgen kann, wurden Membranvesikel mit gebundener F_1-ATPase mit Anti ε F_{ab} inkubiert. Anschließend wurde zum einen die ATPase-Aktivität und zum anderen die ATP-abhängige Fluoreszenslöschung von ACMA gemessen. Dieser fluorimetrische Test charakterisiert die Eigenschaften der F_1-ATPase als Kopplungsfaktor für

energieabhängige Prozesse: Durch ATP-Hydrolyse vermag die membrangebundene F_1-ATPase die Membran zu energetisieren. Dieser Prozeß kann durch die Messung der Fluoreszenslöschung von ACMA verfolgt werden. Dabei ist die Anfangsgeschwindigkeit der Fluoreszenslöschung ein Maß für die energieübertragende Aktivität der ATP-Synthetase ([24]).
Die Fluoreszenslöschung wurde mit membrangebundener F_1-ATPase mit und ohne F_{ab}-Inkubation bestimmt und mit der ATPase-Aktivität zusammen in Abb. 11 aufgetragen. Zum Vergleich werden die Ergebnisse nach Inkubation von löslicher F_1-ATPase (Abb. 9) mit F_{ab} noch einmal dargestellt.
Das Ergebnis zeigt, daß eine Stimulierung durch Anti ε F_{ab} nur bei löslicher F_1-ATPase beobachtet wird. Im membrangebundenen Zustand findet man eine Hemmung sowohl der ATPase-Aktivität als auch der energieübertragenden Aktivität nach Inkubation mit Anti ε F_{ab}.

2.1.5 Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse

Nach Isolierung der F_1-Untereinheiten durch SDS-Gelelektrophorese in präparativem Maßstab (vgl. Abb. 3), wurden Antiseren gegen die einzelnen F_1-Untereinheiten gewonnen.
Diese Antiseren erwiesen sich zunächst als spezifisch (vgl. Abb. 4). Im Falle der Anti γ und Anti ε Antiseren konnten proteolytische Abbauprodukte von β bzw. δ Untereinheiten nicht vollständig abgetrennt werden, so daß die Spezifität dieser Antiseren nach mehrmaligem Booster geringer wurde und Kreuzreaktionen mit der β bzw. δ Untereinheit auftraten (vgl. Abb. 5).

IgG gegen die α, β, δ und ε Untereinheiten reagiert mit der nativen F_1-ATPase unter Bildung eines Präzipitats, IgG gegen die γ Polypeptidkette bildet dagegen kein Präzipitat (vgl. Abb. 6). Ein Subkomplex der F_1-ATPase aus α, γ und ε Untereinheiten zeigte ebenfalls keine Präzipitation mit Anti γ IgG. Spaltet man das Enzym oder den Subkomplex mit SDS oder Harn-

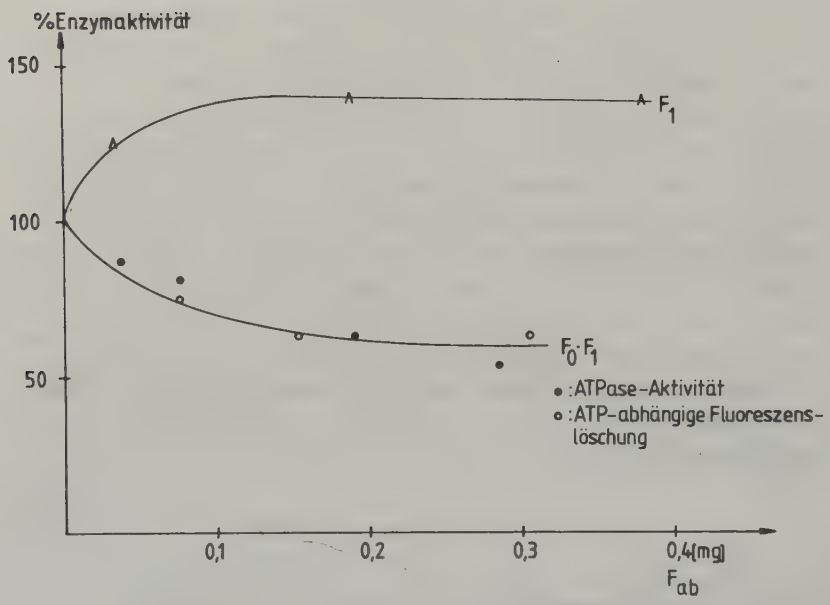

Abb. 11 ATPase-Aktivität von löslicher F_1-ATPase und von Membranvesikeln mit gebundener F_1-ATPase, sowie ATP-abhängige Fluoreszenslöschung als Maß für die energieübertragende Aktivität der ATP-Synthetase nach Inkubation mit Anti ε F_{ab}.
Membranvesikel mit gebundener F_1-ATPase wurden nach Inkubation von ATPase-freien Membranvesikeln (20 mg Membranprotein) und F_1-ATPase (2 mg Protein) in 50 mM MOPS/KOH pH 7,0; 10 mM $MgCl_2$; 2,5 mM Mercaptoäthanol durch Zentrifugieren (120 000 g/90 min) abgetrennt und im gleichen Puffer aufgenommen.
Das Verhältnis der Anfangsgeschwindigkeit der ATP-abhängigen Fluoreszenslöschung mit und ohne Anti ε F_{ab} wurde als prozentuale Änderung der Enzymaktivität aufgetragen.

stoff, so werden positive Reaktionen auch mit Anti γ IgG beobachtet (vgl. Abb. 6 und 7).

Inkubation von F_1-ATPase mit IgG oder F_{ab} gegen die einzelnen F_1-Untereinheiten zeigte die folgenden Einflüsse auf die ATPase-Aktivität (vgl. Abb. 8 und 9):
a) Im Falle der α und β Untereinheiten eine Hemmung;
b) bei γ und δ Untereinheiten keinen oder nur geringen Einfluß;
c) bei der ε Untereinheit eine Stimulierung.

Die Stimulierung durch Anti ε F_{ab} erfolgt auch, wenn die F_1-ATPase zuvor durch isolierte ε Untereinheit gehemmt wurde (vgl. Tab. 1). Sie konnte allerdings nur bei löslicher F_1-ATPase und nicht im membrangebundenen Zustand beobachtet werden (vgl. Abb. 11). In diesem Fall wurde eine Hemmung sowohl der ATPase-Aktivität, als auch der energieübertragenden Aktivität der gesamten ATP-Synthetase beobachtet (vgl. Abb. 11).

Bisher wurden von verschiedenen Autoren Antiseren gegen die Untereinheiten von F_1-ATPasen aus unterschiedlichen Organismen beschrieben ([42,45,52,57,76,84]). Tab. 2 zeigt die inhibitorische Wirkung dieser Antiseren auf die ATPase-Aktivität bei F_1-ATPasen von E.coli, von Chloroplasten* und von dem thermophilen Bakterium PS 3.*
Mit Ausnahme der Antiseren gegen die TF_1-Untereinheiten, die sich in nativer Form isolieren lassen, wurden fast alle Antiseren gegen SDS-denaturierte Antigene gewonnen.
Bei den von Kanner et al. ([42]) beschriebenen Antiseren gegen die F_1-Untereinheiten α, β und γ wurde weder die Spezifität der Antiseren noch ihre präzipitierende Wirkung auf die native F_1-ATPase untersucht, so daß die mit diesen Antiseren erzielten Ergebnisse wenig aussagekräftig sind. Dagegen zeigte ein von Laget et al. ([45]) beschriebenes Anti ε Antiserum einen stimulierenden Einfluß auf die F_1-ATPase, wie er auch hier

* Die F_1-ATPasen von Chloroplasten und von dem thermophilen Bakterium PS 3 werden mit CF_1 und TF_1 abgekürzt.

beobachtet wurde.
Antiseren gegen die CF_1-Untereinheiten α und β zeigen im Vergleich zu den TF_1-Untereinheiten und den hier gefundenen Ergebnissen eine geringere Hemmung der Enzymaktivität. Ursache dafür könnte eine veränderte Primärstruktur bei dem Chloroplastenenzym sein, so daß trotz Antikörperbindung keine Enzymhemmung erfolgen kann.
Mit Ausnahme der Anti ε Antiseren stimmen die in dieser Arbeit beobachteten Werte mit denen, die bei TF_1 gefunden wurden, weitgehend überein. Offensichtlich hat die ε Untereinheit in beiden ATPasen verschiedene Funktionen: Während sie bei dem E.coli-Enzym als ATPase-Inhibitor wirkt ([78]), wurde dies bei TF_1 nicht beobachtet ([85]). Dies erklärt auch die unterschiedlichen Einflüsse der Anti ε Antiseren bei beiden Enzymen.

Tab. 2 Vergleich der inhibitorischen Wirkung verschiedener Antiseren gegen die F_1-Untereinheiten.
Die Angaben beziehen sich auf die verbleibende Enzymaktivität nach Inkubation mit Antiseren.

	F_1-ATPase		CF_1	TF_1
	Diese Arbeit	Andere Autoren	Nelson et al. ([52])	Yoshida et al. ([84])
Anti α	10 %	25 % ([42])	78 %	19 %
Anti β	10 %	72 % ([42])	74 %	0 %
Anti γ	80 %	84 % ([42])	97 %	130 %
Anti δ	100 %	-	75 %	94 %
Anti ε	220 %	244 % ([45])	-	94 %

2.2 Anordnung der unc Gene auf dem E.coli Chromosom

Die Untereinheiten der ATP-Synthetase konnten nach Isolierung des Enzyms identifiziert werden (23,24). Neben den fünf F_1-Untereinheiten α-ε wurden weitere F_0-Untereinheiten a, b und c mit Molekulargewichten von 28 000, 19 000 und 8 500 gefunden. Diese Untereinheiten konnten auch als Biosyntheseprodukte eines λ Phagen (λ asn) mit den unc Genen identifiziert werden (24). Ob ein weiteres Protein mit Molekulargewicht 24 000 dem F_0-Teil angehört ist umstritten. Dieses Protein konnte in unterschiedlichen Mengen in Präparationen des isolierten Enzymkomplexes nachgewiesen werden, die nach verschiedenen Verfahren gewonnen wurden (23,24).
Abb. 12 zeigt ein analytisches Polyacrylamidgel mit den ATP-Synthetase Untereinheiten nach Elektrophorese in Gegenwart von SDS und nach Coomassie-Anfärbung. Das Enzym wurde nach (24) isoliert und freundlicherweise von P.Friedl zur Verfügung gestellt. Neben den F_1-Untereinheiten α-ε sind die F_0-Untereinheiten a, b, c und das Protein mit Molekulargewicht 24 000, sowie Cytochrom b_1 und einige proteolytische F_1-Abbauprodukte als Verunreinigung zu sehen.
Wie für die F_1-Untereinheiten beschrieben, wurden Antiseren gegen die F_0-Untereinheiten a, b und c gewonnen (26) und für die nachfolgenden Versuche von P.Friedl überlassen.

Die ATP-Synthetase von E.coli ist eine der wenigen ATP-Synthetasen, die auch mit genetischen Methoden untersucht wurden. Mutanten des Phänotyps unc^- besitzen eine veränderte ATP-Synthetase und lassen sich in fünf verschiedene Komplementationsgruppen, entsprechend fünf verschiedenen Genen (unc A - unc E) einteilen (16). Nur Mutanten unterschiedlicher Komplementationsgruppen zeigen nach Komplementation in vivo wieder den unc^+ Phänotyp des Wildtyps. Durch biochemische Charakterisierung von einigen unc A und unc D Mutanten konnte nachgewiesen werden, daß die α Untereinheit durch das unc A und die β Untereinheit

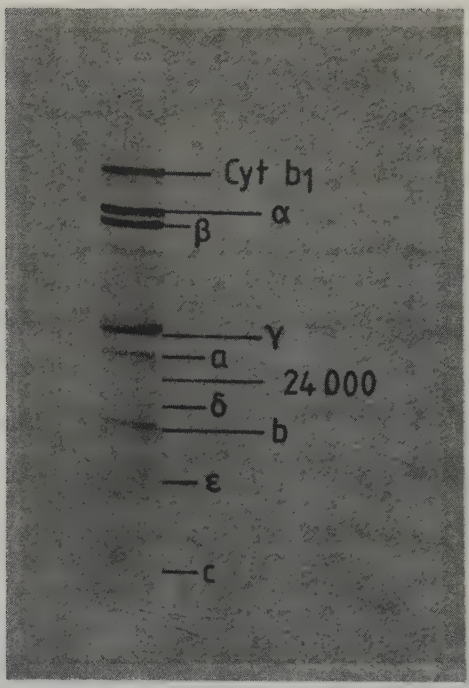

Abb. 12 Analytisches Polyacrylamidgradientengel nach Elektrophorese von ATP-Synthetase in Gegenwart von SDS. (15 µg Protein)

durch das unc D Gen codiert wird ([18],[41],[69]).
Um die Reihenfolge der unc Gene zu bestimmen, erwies sich die Charakterisierung von verschiedenen Mu-induzierten unc Mutanten als günstig ([31]). Der lysogene Mu-Phage kann an sehr vielen Stellen des E.coli Chromosoms, so auch in der unc Region, integriert werden. Insertion des Phagen übt einen hochpolaren Effekt auf die nachfolgenden Gene aus, so daß fast alle bisher bekannten unc Gene durch Mu-Phagen Insertionen inaktiviert werden können, wie durch Komplementationsversuche in vivo nachgewiesen wurde ([31]). Ergebnis dieser Analyse war, daß die

unc Gene in der Reihenfolge unc B E A D C transskribiert werden ([31]). Welche Genprodukte durch die Gene unc B, unc C und unc E codiert werden, konnte bisher nocht nicht geklärt werden.

Um im Gegensatz zu den Komplementationsversuchen eine eindeutige Zuordnung von Gen und Genprodukt zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit die genetische Veränderung auf dem Niveau der synthetisierten Proteine nachgewiesen. Antiseren gegen die ATP-Synthetase Untereinheiten ermöglichten einen einfachen Nachweis dieser Proteine im Wildtyp und in Mutanten.

Zur Isolierung von Mu-induzierten unc Mutanten wurde von H.U. Schairer in Analogie zu lac und trp Mutanten ([9,21]) ein Verfahren ausgearbeitet, um Mutanten mit einem möglichst breiten Deletionsmuster zu erhalten:

Zunächst wurden vier unc Mutanten isoliert, die einen thermosensitiven Mu-Phagen (Mu cts) in der unc Region tragen. Nach Hitzeinduktion des Mu-Phagen sollten in überlebenden Zellen Deletionen in benachbarten Genen auftreten.

Im Gegensatz zum lac- und trp Operon war im Falle der unc Mutanten eine Selektion auf Mutanten mit Deletionen nicht möglich, da in unmittelbarer Umgebung der unc Region keine geeigneten Selektionsmarken vorhanden sind. Deshalb wurde versucht, mit Hilfe eines Radioimmunoassays möglichst viele unc Mutanten zu charakterisieren.

Alle in diesem Zusammenhang erwähnten unc Mutanten wurden von H.U. Schairer isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.1 Charakterisierung von Mu-induzierten unc Mutanten mit einem Radioimmunoassay

Zur Charakterisierung von Mu-induzierten unc Mutanten wurde eine Technik benutzt, die zum Auffinden von Mutanten mit fehlendem Protein II*, einem Protein der äußeren Membran von E.coli entwickelt wurde ([34]): Durch Bindung von radiojodierten Antikörpern an dieses Protein, das an der Oberfläche der Zellen für Antikörper leicht zugänglich ist, war es möglich, Mutanten mit und ohne Protein II* zu unterscheiden.
Erstaunlicherweise gelang ein solcher Nachweis auch mit den Proteinen der Plasmamembran, die für die Antikörperbindung zunächst nicht direkt zugänglich sind.
Kolonien werden von einem Agar-Nährboden auf ein Filterpapier übertragen, die übertragenen Zellen mit Chloroformdampf behandelt und mit radiojodierten Anti α oder Anti β Antikörper inkubiert.
Abb. 13 zeigt die durch Coomassie-Anfärbung sichtbargemachten Zellkolonien auf dem Filterpapier und die entsprechenden Autoradiographien nach Inkubation mit radiojodierten Antikörpern gegen α und β Untereinheiten am Beispiel von neun verschiedenen E.coli Stämmen:
In der ersten Reihen sind drei Kontrollstämme, Wildtyp A1 und zwei unc⁻ Punktmutanten (BH 212, BH 526), bei denen die α und β Untereinheiten jeweils vorhanden sind.
Die übrigen Stämme sind unc Mutanten, von denen vier den thermosensitiven Mu-Phagen tragen (AS 11, AS 12, AS 69 und AS 150) und zwei nach Hitzeinduktion von AS 12 und AS 69 isoliert wurden (AS 12/25 und AS 69/1).
Offensichtlich kann man zwei verschiedene Klassen unterscheiden:
Bei Typ A fehlt die β Untereinheit (α^+, β^-) wie bei den Mutanten der zweiten Reihe.
Bei Typ B fehlen die α und β Untereinheiten (α^-, β^-) wie bei den Mutanten der dritten Reihe.
Ein Nachweis der γ, δ und ε Untereinheiten war mit den zur

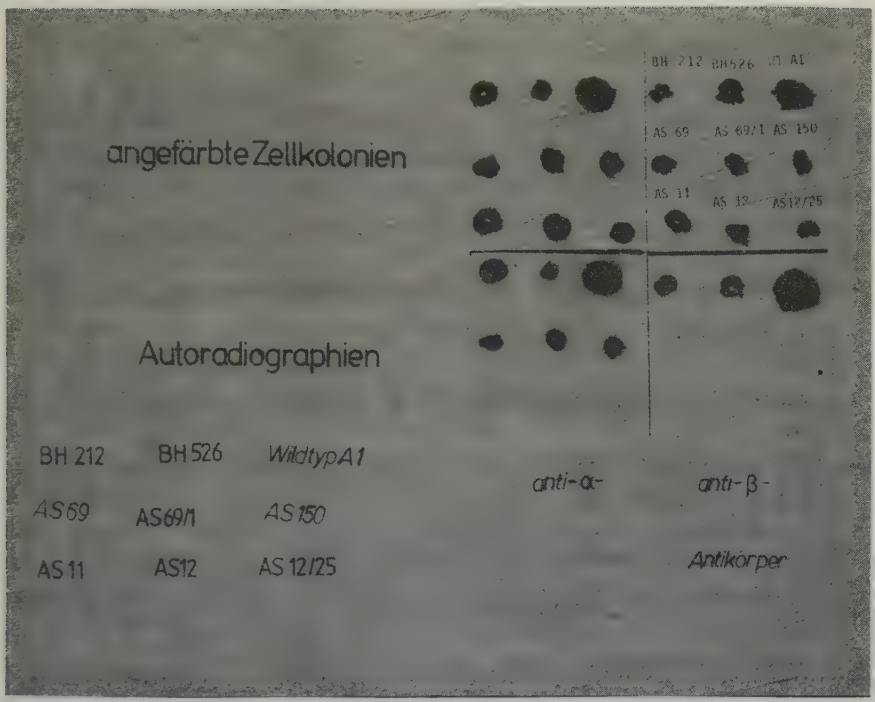

Abb. 13 Nachweis von α und β Untereinheiten im Wildtyp und in Mutanten.

Verfügung stehenden nicht völlig spezifischen Antikörpern nicht möglich.
Ausgehend von AS 12 (α^-, β^-) und AS 69 (α^+, β^-) wurden nach Hitzeinduktion des Phagen je 300 Mutanten isoliert und mit der hier beschriebenen Technik analysiert. Alle Derivate waren jedoch gegenüber dem jeweiligen Ausgangsstamm unverändert. Exemplarisch ist dies für einige Derivate von AS 12 und AS 69 in Abb. 14 gezeigt. Derivate der Mutante AS 69 sind weiterhin vom Typ A (α^+, β^-), während solche der Mutante AS 12 vom Typ B (α^-, β^-) sind.
Wildtyp A1, die unc$^-$ Punktmutante BH 212 und die zuvor gezeigten Mutanten dienten als Kontrollen.

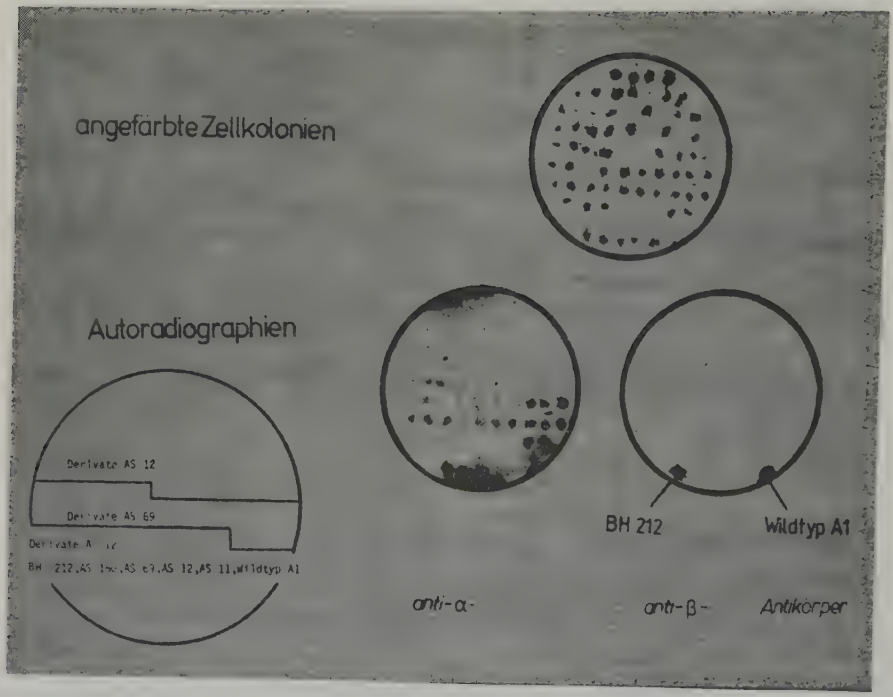

Abb. 14 Nachweis von α und β Untereinheiten in Mutanten, die nach Hitzeinduktion von den Mutanten AS 12 und AS 69 isoliert wurden.

2.2.2 Nachweis von ATP-Synthetase Untereinheiten in *unc* Mutanten mit einer Immun-Replika-Technik

Um die Reihenfolge der *unc* Gene auf dem Genom festzulegen, war es notwendig nachzuweisen, ob in den Mutanten der verschiedenen Typen neben den α bzw. β Untereinheiten andere ATP-Synthetase Untereinheiten vorhanden sind oder fehlen. Eine Methode, die einen solchen Nachweis mit Hilfe der vorhandenen Antiseren erbringen soll, muß folgenden Anforderungen genügen:

- Der Nachweis der ATP-Synthetase Untereinheiten sollte aus Zellextrakten erfolgen, da eine Isolierung des Enzyms bei vielen *unc* Mutanten nach Standardmethoden nicht möglich ist.
- Neben der spezifischen Antikörper-Antigen-Erkennung sollte eine eindeutige Identifizierung der jeweiligen Untereinheit an Hand des Molekulargewichtes erfolgen.
- Der Nachweis darf nicht durch SDS gestört werden, da dieses Detergenz zur Spaltung der F_1-ATPase und zur Elution der membranintegrierten F_o-Untereinheiten aus der Plasmamembran notwendig ist.

Diese Anforderungen werden von Immun-Replika-Techniken erfüllt, mit denen zuvor Antiseren gegen die F_1-Untereinheiten charakterisiert wurden (vgl. 2.1.1.2). Anwendung dieser Technik mit Agarose-Immuno-Gelen ermöglichte zwar den Nachweis von einigen F_1-Untereinheiten aus Zellextrakten (vgl. 5.12.3.2), aber nicht den der F_o-Untereinheiten. Deshalb wurde eine im Prinzip ähnliche Replika-Technik mit Zellulosenitratfolien benutzt, die auch den Nachweis der F_o-Untereinheiten ermöglichte ([79]):

Nach elektrophoretischer Trennung in Polyacrylamidgradientengelen wurden die Proteine durch elektrophoretische Eluation auf eine Zellulosenitratfolie übertragen. Mit Hilfe von spezifischen Antiseren von Kaninchen und mit radiojodierten Anti Kaninchen-IgG Antikörper von der Ziege ließen sich Antigene auf dieser Folie spezifisch nachweisen.

Mit dieser Technik wurden im folgenden acht verschiedene

unc Mutanten charakterisiert: Vier Stämme mit dem Mu-Prophagen AS 11, AS 12, AS 69, AS 150 und vier Stämme, die nach Hitzeinduktion von AS 12 und AS 69 isoliert und zufällig ausgewählt wurden (AS 12/25, AS 12/1933, AS 69/1, AS 69/0751).

2.2.2.1 Nachweis der F_1-Untereinheiten

Zum Nachweis der F_1-Untereinheiten wurden Zellextrakte durch Polyacrylamidgradientengelelektrophorese in Gegenwart von SDS nach Molekulargewicht getrennt.
Abb. 15 zeigt ein solches Gel nach Coomassie-Anfärbung. Als Molekulargewichtsstandard und als Kontrolle für die Spezifität der Antikörper wurden jeweils Zellextrakte vom Wildtyp und F_1-ATPase benutzt.

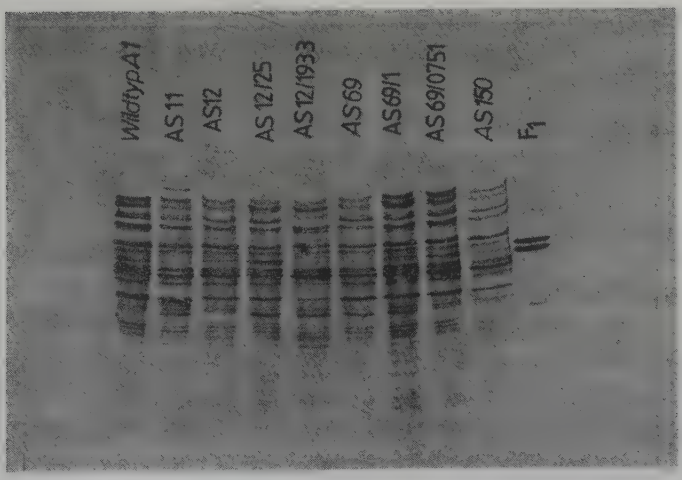

Abb. 15 Polyacrylamidgradientengel mit Zellextrakten (30 µg Protein) verschiedener unc Mutanten und vom Wildtyp sowie mit F_1-ATPase (5 µg Protein)

Von solchen Polyacrylamidgelen wurden die Proteine durch elektrophoretische Elution auf Zellulosenitratfolien übertragen. Mit Hilfe von Antikörpern gegen α, β und δ Untereinheiten von Kaninchen und mit radiojodierten Anti Kaninchen-IgG Antikörper von der Ziege wurden die jeweiligen F_1-Untereinheiten nachgewiesen.
Abb. 16-18 zeigen die entsprechenden Autoradiographien nach Inkubation mit den verschiedenen Antikörpern.
Ein Nachweis der γ und ε Untereinheiten war wegen der geringen Spezifität der entsprechenden Antiseren nicht möglich (vgl. 2.1.1.2).
Die Ergebnisse bestätigen, daß bei Mutanten vom Typ A nur die β Untereinheit fehlt (AS 69, AS 69/1, AS 69/0751, AS 150), während bei Mutanten vom Typ B sowohl α als auch β Untereinheiten fehlen (AS 11, AS 12, AS 12/25, AS 12/1933,).
Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß die δ Untereinheit in Typ A und B vorhanden ist.

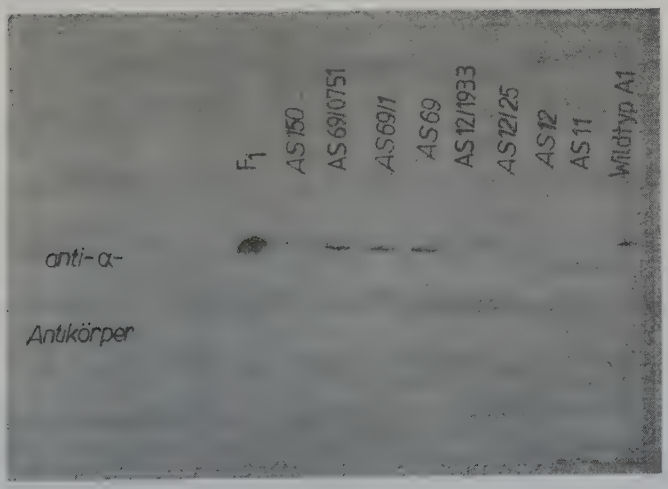

Abb. 16 Nachweis der α Untereinheit in verschiedenen unc Mutanten und im Wildtyp

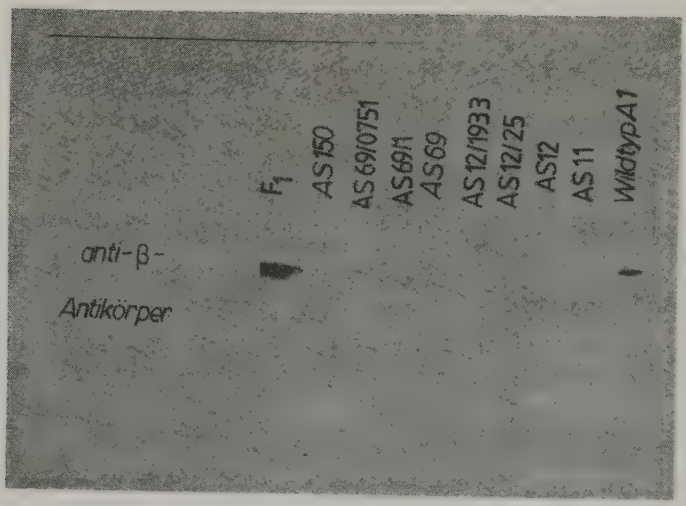

Abb 17 Nachweis der β Untereinheit in verschiedenen unc Mutanten und im Wildtyp

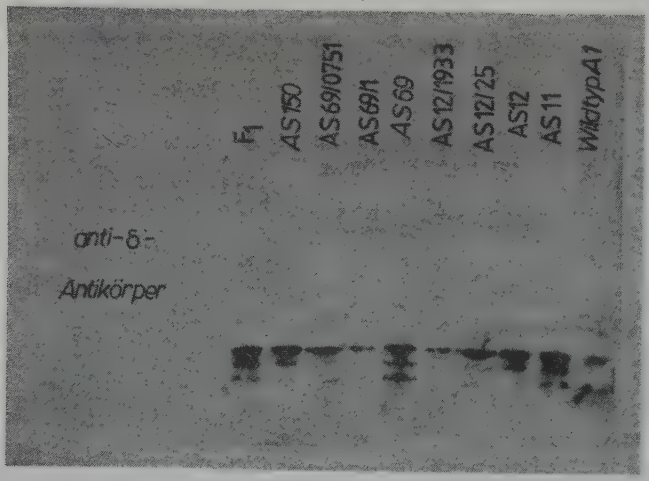

Abb. 18 Nachweis der δ Untereinheit in verschiedenen unc Mutanten und im Wildtyp

In einigen Fällen zeigen die Autoradiographien neben der vollständigen F_1-Untereinheit auch Banden mit kleineren Molekulargewichten. Dies sind vermutlich proteolytische Abbauprodukte, die vor allem bei der δ Untereinheit verstärkt auftreten, wie auch mit der Agarose-Immun-Replika-Technik festgestellt wurde (vgl. Abb. 5).
Proteolytischer Abbau kann einen Nachweis von genetischen Veränderungen auf dem Niveau der fertig synthetisierten Proteine unmöglich machen: Durch vollständigen proteolytischen Abbau des Produkts kann eine Deletion des Gens vorgetäuscht werden. Im Falle der α und δ Untereinheiten wurde ein vollständiger proteolytischer Abbau in den unc Mutanten nicht beobachtet. Partieller tryptischer Abbau von F_1-ATPase ergab, daß die γ, δ und ε Untereinheiten schneller abgebaut werden als die α und β Polypeptidketten ([50]). Im Falle der β Untereinheit ist es daher unwahrscheinlich, daß ein vollständiger proteolytischer Abbau dieser Untereinheit unter Bedingungen erfolgt, bei denen die δ Polypeptidkette erhalten bleibt.

2.2.2.2 Nachweis der F_0-Untereinheiten

Zum Nachweis der F_0-Untereinheiten a, b und c wurden Membranfraktionen der verschiedenen unc Mutanten und des Wildtyps isoliert. Nach Polyacrylamidgradientengelelektrophorese (Abb. 19) wurden die Proteine im Falle der a und b Untereinheiten durch elektrophoretische Elution (vgl. Abb. 30 b) und bei der c Untereinheit durch Diffusion mit dem aufsteigenden Pufferstrom (vgl. Abb. 30 a) auf die Zellulosenitratfolie übertragen. Die Autoradiographien nach Inkubation mit den verschiedenen Antikörpern zeigen Abb. 20 -22.
Das Ergebnis zeigt, daß sich Mutanten vom Typ A und B bei den F_0-Untereinheiten nicht unterscheiden. In beiden Typen fehlt die b Untereinheit, während die a und c Untereinheiten vorhanden sind.
Mehrfachbanden, die mit Anti a Antiserum bei Membranfraktionen

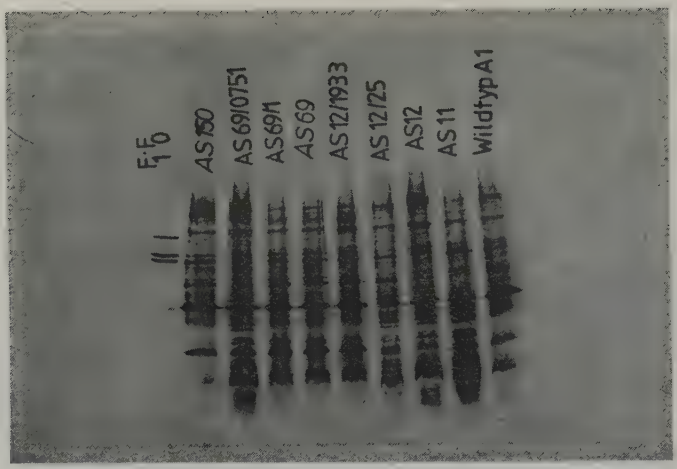

Abb. 19 Polyacrylamidgradientengel mit Membranfraktionen (30 µg Protein) verschiedener unc Mutanten und vom Wildtyp, sowie mit ATP-Synthetase (10 µg Protein)

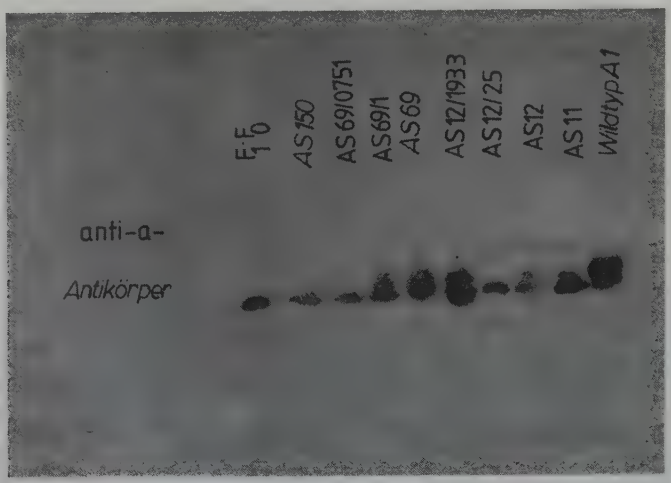

Abb. 20 Nachweis der a Untereinheit in verschiedenen unc Mutanten und im Wildtyp

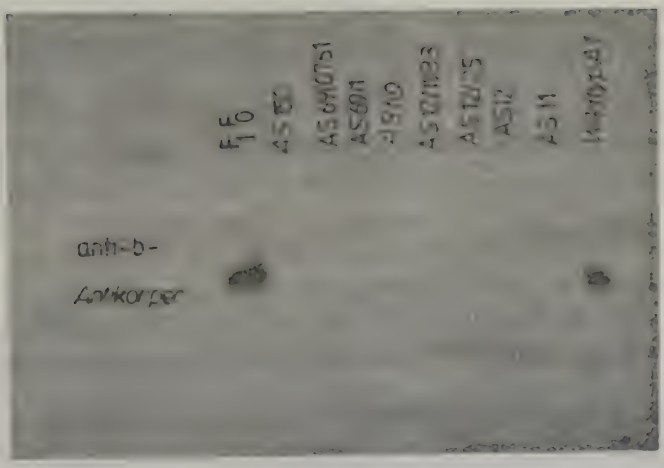

Abb. 21 Nachweis der b Untereinheit in verschiedenen unc Mutanten und im Wildtyp.

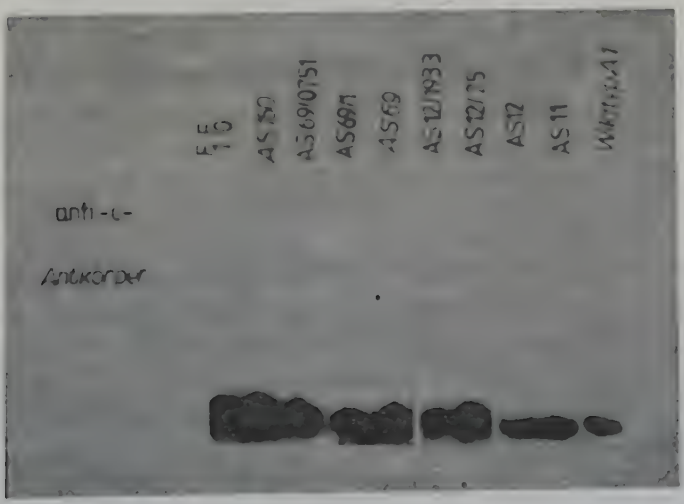

Abb. 22 Nachweis der c Untereinheit in verschiedenen unc Mutanten und im Wildtyp

beobachtet wurden, erklären sich möglicherweise dadurch, daß diese Untereinheit auch in Gegenwart von Detergenz einen Komplex mit einer anderen Membrankomponente (c Untereinheit ?) bildet.

Kreuzreaktionen der Antiseren gegen die F_0-Untereinheiten mit den F_1-Untereinheiten, die zunächst beobachtet wurden, konnten dadurch verhindert werden, daß die Antikörper gegen die F_1-Untereinheiten durch Immunadsorbenschromatographie an immobilisierter F_1-ATPase abgetrennt werden konnten. Auch diese Verunreinigung der Antiseren ist vermutlich dadurch entstanden, daß bei der Isolierung der Antigene durch Gelelektrophorese proteolytische F_1-Abbauprodukte nicht vollständig abgetrennt wurden. Die zur Kontrolle aufgetragene ATP-Synthetase beweist, daß die so gereinigten Antiseren jeweils nur eine Bande mit den entsprechenden F_0-Untereinheiten zeigen und schließt so unspezifische Reaktionen aus.

Die b Untereinheit fehlte auch in Zellextrakten der unc Mutanten, wie in analogen Versuchen gezeigt wurde.

2.2.3 Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Anwendung von immunchemischen Methoden zum Nachweis von ATP-Synthetase Untereinheiten in unc Mutanten ergab, daß zwei verschiedene Typen von Mutanten gefunden wurden (Tab. 3).

Es besteht kein Unterschied zwischen Mutanten mit einem thermosensitiven Mu-Prophagen (AS 12 und AS 69) und den nach Hitzeinduktion isolierten Derivaten (AS 12/25, AS 12/1933, AS 69/1, AS 69/0751).

Die Tatsache, daß durch Mu-Phagen-Insertion in die unc Region mehrere Gene inaktiviert werden, läßt darauf schließen,

Tab. 3 Nachweis von ATP-Synthetase Untereinheiten in verschiedenen unc Mutanten

Mutanten	α	β	δ	a	b	c Untereinheiten
Typ A: AS 69	+	-	+	+	-	+
AS 69/1	+	-	+	+	-	+
AS 69/0751	+	-	+	+	-	+
AS 150	+	-	+	+	-	+
Typ B: AS 11	-	-	+	+	-	+
AS 12	-	-	+	+	-	+
AS 12/25	-	-	+	+	-	+
AS 12/1933	-	-	+	+	-	+

daß die unc Gene eine transskriptorische Einheit bilden ([31]). Unter dieser Voraussetzung lassen sich die Ergebnisse mit einer Anordnung der unc Gene erklären, die in Abb. 23 wiedergegeben ist.
Mutanten vom Typ A entstehen dadurch, daß die Phagen-Insertionsstelle vor den Genen unc β* und unc b* liegt, die infolge polarer Mutation in Mutanten dieses Typs nicht exprimiert werden. Liegt die Insertionsstelle vor uncα, so werden alle drei nachfolgenden Gene nicht abgelesen und es entstehen Mutanten vom Typ B (vgl. Abb. 23).

Wie am Beispiel von Mu-induzierten lac Mutanten gezeigt wurde ([9]), gibt es nach Hitzeinduktion von Stämmen mit einem thermosensitiven Mu-Prophagen zwei Arten von überlebenden Zellen: a) Zellen mit einem defekten Mu-Prophagen, der nicht

* Im Gegensatz zu der von Gibson et al. verwendeten Terminologie, die die durch Komplementation definierten unc Gene mit unc A, unc B ... bezeichnen ([31]), werden hier die Gene, die α, β ,... Untereinheiten codieren, mit unc α, unc β... bezeichnet.

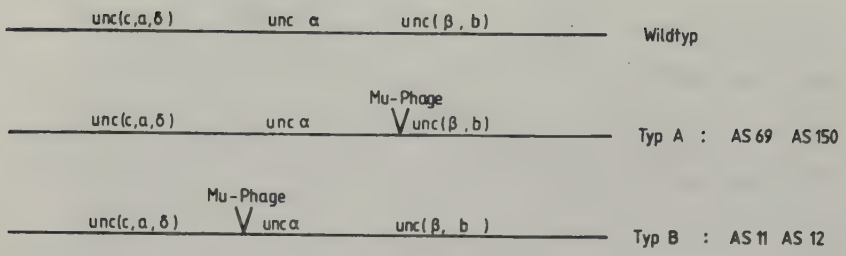

Abb. 23 Anordnung der unc Gene im Wildtyp und in Mutanten
Die Reihenfolge der Gene in runden Klammern ist beliebig.

aus dem Wirtsgenom ausgeschnitten wurde und b) Zellen mit vollständig deletierten Phagen. Um zu unterscheiden, ob bei den vier hier charakterisierten Derivaten von AS 12 und AS 69, die nach Hitzeinduktion isoliert wurden, der Mu-Phage vollständig entfernt wurde, wurde getestet, ob diese Stämme mit dem Mu-Phagen infizierbar sind oder nicht. Dieser Test wurde nach ([24]) in Analogie zum P 1 Phagen durchgeführt und ergab, daß drei der Derivate (AS 12/1933, AS 69/1 und AS 69/0751) Mu-Phagen insensitiv sind, während der Stamm AS 12/25 sensitiv für den Mu-Phagen ist. Für die insensitiven Stämme gibt es eine einfache Erklärung dafür, daß sie vom gleichen Typ wie die Ausgangsstämme sind: In diesem Fall bleibt ein defekter Mu-Prophage in der unc Region zurück, der die polare Mutation aufrecht erhält.
Bei der Mutanten AS 12/25 dagegen wurde der Mu-Phage vollständig eliminiert. Offensichtlich wurde nur vom rechtsseitigen Phagenende aus ein größeres Stück Wirts-DNA entfernt. Solche

"einseitigen" Deletionen wurden auch beim trp Operon beobachtet ([21]) und traten dort häufiger auf als "beidseitige" Deletionen.
Möglicherweise besteht im Falle der unc Mutanten ein Selektionsdruck auf "rechtsseitige" Deletionen, denen die b Untereinheit fehlt. Dadurch würde sowohl bei den Derivaten von AS 12 als auch bei solchen von AS 69 keine Änderung der Mutation zu beobachten sein. Ursache für diesen Selektionsdruck ist, daß aus a, c und b Untereinheiten ein intakter Protonenkanal in der Plasmamembran entstehen würde, der ohne eine gekoppelte F_1-ATPase für die Zelle letal wäre.

2.3 Die b Untereinheit ist Bestandteil des Protonenkanals

Intakte Membranvesikel sind relativ impermeabel für Protonen. Wird die F_1-ATPase abgelöst, so führt dies zu einer erhöhten Protonenpermeabilität der Membran, da der F_o-Teil als Protonenkanal wirkt ([55],[65]). Über die permeable Membran kann sich kein Protonengradient aufbauen und daher sind solche Membranvesikel in enrgieübertragenden Prozessen weitgehend entkoppelt. Durch Zugabe von F_1-ATPase oder durch Blockierung des F_o-Teils mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) wird die Membran wieder protonenundurchlässig ([63]). DCCD reagiert spezifisch mit dem Asparaginsäurerest Nr.61 der c Untereinheit, die deswegen auch DCCD-bindendes Protein genannt wird ([67]). Der oligomere F_o-Teil besteht zumindest bei dem thermophilen Bakterium PS 3 vermutlich aus zwei a, einer b und 5-6 c Untereinheiten ([39]). Da DCCD nur mit einer der c Untereinheiten reagiert, könnte ein Protonenkanal alleine aus den c Untereinheiten aufgebaut sein. Direkt ließ sich dies bisher nach Rekonstitution von isolierter c Untereinheit in Liposomen nicht eindeutig nachweisen ([2],[14],[53],[74]).
Bei den hier beschriebenen unc Mutanten fehlt die b Untereinheit, während die a und c Untereinheiten in Membranvesikeln vorhanden sind. Da die a Untereinheit sehr wahrscheinlich nicht Bestandteil des Protonenkanals ist ([73]) und da nachgewiesen werden konnte, daß die in den Membranvesikeln der Mutante vorhandene c Untereinheit identisch mit der des Wildtyps ist ([35]), könnte ein Vergleich der protonenleitenden Eigenschaften der Membranvesikel des Wildtyps und der Mutante Hinweise darauf geben, ob die b Untereinheit Bestandteil des Protonenkanals ist.

2.3.1 Messung der Protonenpermeabilität mit K^+-beladenen Membranvesikeln des Wildtyps und der unc Mutante AS 12

Die relative Protonenpermeabilität wurde mit Membranvesikeln der unc Mutanten AS 12, AS 12/1933 und AS 69/0751 gemessen. Die Ergebnisse mit der Mutante AS 12 sind repräsentativ für alle drei Mutanten.

Mit der Immun-Replika-Technik wurde jeweils nachgewiesen, daß in den Präparationen der Membranvesikel keine F_1-Untereinheiten vorhanden waren, die den Protonenfluß durch den F_o-Teil beeinflussen könnten.

Zur Messung der relativen Protonenpermeabilität in Membranvesikeln nach ([56]) wurden diese mit Kaliumionen beladen und anschließend in einen Puffer ohne Kaliumionen überführt. Durch Zugabe von Valinomycin werden Membranvesikel permeabel für Kaliumionen, jedoch nicht für die enstsprechenden Gegenanionen. Strömen Kaliumionen aus dem Lumen der Membranvesikel, so baut sich eine elektrische Potentialdifferenz auf, die durch Gegentransport von Protonen abgebaut werden kann. Der sich dadurch aufbauende Protonengradient läßt sich durch einen Fluoreszensfarbstoff wie ACMA nachweisen. Nach Inkubation der Membranvesikel mit DCCD wird der Anteil der Protonenpermeabilität bestimmt, der DCCD insensitiv ist.
Abb. 24 zeigt die Fluoreszenslöschung von ACMA nach Zugabe von Valinomycin mit Membranvesikeln des Wildtyps und der unc Mutante AS 12. Offensichtlich ist die Protonenpermeabilität im Falle der Mutante stark reduziert.
Diese Beobachtung macht es wahrscheinlich, daß die b Untereinheit ein Bestandteil des Protonenkanals ist.

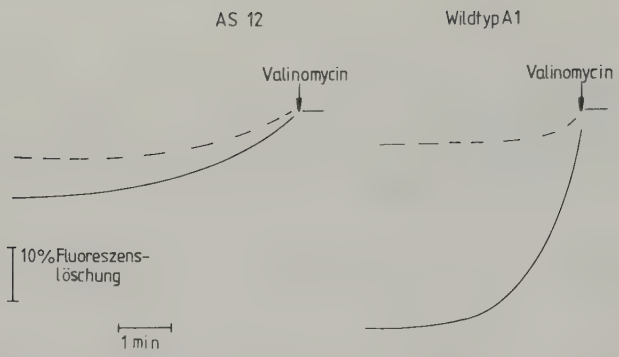

Abb. 24 Relative Protonenpermeabilität mit K^+-beladenen F_1-ATPase freien Membranvesikeln des Wildtyps und der unc Mutante AS 12.
K^+-beladene Membranvesikel wurden nach ([56]) in ein K^+-freies Medium überführt. Nach Valinomycinzugabe strömen K^+ nach außen und bauen damit indirekt einen Protonengradienten auf, der durch Fluoreszenslöschung von ACMA nachgewiesen wurde. Die Differenzen im Grade der Fluoreszenslöschung vor (——) und nach (------) Umsetzung mit DCCD sind ein relatives Maß für die Protonenpermeabilität des F_o-Teils.

3 Diskussion

Die ATP-Synthetase von E.coli, ein Enzymkomplex der Plasmamembran, der im Energiestoffwechsel der Zelle eine wichtige Rolle spielt, besteht zumindest aus acht verschiedenen Untereinheiten, von denen fünf (α, β, γ, δ, ε) der membranperipheren F_1-ATPase und drei (a, b, c) dem membranintegrierten F_o-Teil angehören.
Mit Hilfe von Antiseren gegen die ATP-Synthetase Untereinheiten wurde dieser Enzymkomplex immunchemisch im Wildtyp und in Mutanten charakterisiert.

3.1 Die F_1-ATPase

Zur immunchemischen Charakterisierung der F_1-ATPase wurden Antiseren gegen die einzelnen F_1-Untereinheiten gewonnen. Anschließend wurde untersucht, ob diese Antiseren die native F_1-ATPase präzipitieren können und welche Auswirkungen die Antikörperbindung an die verschiedenen Untereinheiten auf die ATPase-Aktivität hat. Diese Ergebnisse sollen im folgenden interpretiert und mit anderen Beobachtungen verglichen werden, um eine Vorstellung davon zu erhalten, welche Funktionen die F_1-Untereinheiten im F_1-ATPase-Komplex ausüben.
Nach Bindung von IgG oder F_{ab} an die α und β Untereinheiten wird die ATPase-Aktivität fast vollständig inhibiert. Eine plausible Erklärung dafür ist, daß diese beiden Untereinheiten an der ATP-Hydrolyse direkt beteiligt sind. Antikörperbindung verursacht eine Konformationsänderung dieser Untereinheiten, so daß das Enzym in beiden Fällen inaktiviert wird.
Dieses Ergebnis wird durch verschiedene Beobachtungen anderer Autoren unterstützt: Nach Trypsinbehandlung der F_1-ATPase erhält man einen Komplex aus α und β Untereinheiten, der noch hydrolytisch aktiv ist ([50]). Umsetzung der F_1-ATPase mit Aminosäure-modifizierenden Reagentien oder photochemisch aktivier-

baren Substratanaloga ergab, daß solche Reagentien durch Bindung an die α und β Untereinheiten die ATPase-Aktivität hemmen ([47]).

Antikörper gegen die γ Untereinheit vermögen die native F_1-ATPase nicht zu präzipitieren. Dies wurde auch mit Anti γ Antiseren bei F_1-ATPasen von dem thermophilen Bakterium PS 3 und von Chloroplasten gefunden ([52,84]).
Diese Untereinheit ist möglicherweise in der F_1-ATPase zentral angeordnet, so daß eine Antikörperbindung an diese Untereinheit aus sterischen Gründen nicht möglich ist. Dies steht in Einklang mit einem Modell der F_1-ATPase von E.coli, das von Bragg et al. ([7]) auf Grund von Versuchen mit quervernetzenden Reagentien aufgestellt wurde. Auch in diesem Fall ist die γ Untereinheit zentral angeordnet.
Doppeldiffusionsexperimente mit der nächst kleineren Einheit der F_1-ATPase, einem Subkomplex aus je einer α, γ und ε Untereinheit ([80]), zeigten, daß keine Präzipitatbildung mit Anti γ IgG und diesem Subkomplex beobachtet wird.
Inwieweit diese Untereinheit bei der ATP-Hydrolyse beteiligt ist, kann mit Anti γ IgG nicht entschieden werden, da eine Antikörperbindung an diese Untereinheit im nativen Enzym nicht nachgewiesen werden konnte. Versuche, aus isolierten Untereinheiten einen hydrolytisch aktiven Komplex zu rekonstituieren, ergaben, daß die γ Untereinheit neben den α und β Polypeptidketten benötigt wird ([19]). Möglicherweise kann ein aktives Zentrum aus α und β Untereinheiten nur mit Hilfe der γ Untereinheit aufgebaut werden.

Die δ Untereinheit ist an der ATP-Hydrolyse nicht beteiligt. IgG-Bindung an diese Untereinheit zeigte keinen Einfluß auf die ATPase-Aktivität. Ältere Beobachtungen bestätigen dies, da ein vier Untereinheiten Enzym ohne die δ Polypeptidkette gleiche hydrolytische Eigenschaften wie das fünf Untereinheiten Enzym besitzt, jedoch nicht mehr an Membranvesikeln binden kann ([71]). Diese Untereinheit ist für die Bindung der F_1-ATPase an den F_0-Teil notwendig.

Bindung von IgG oder F_{ab} an die ε Untereinheit stimuliert die ATPase-Aktivität um das Doppelte. Dies wurde auch mit einem Anti ε Antiserum beobachtet, das nicht gegen SDS-denaturiertes Antigen gewonnen wurde (45).
Wie von Sternweis et al. nachgewiesen wurde, ist die isolierte ε Untereinheit ein ATPase-Inhibitor für die lösliche F_1-ATPase, aber nicht für das membrangebundene Enzym (78). Eine Stimulierung durch Anti ε Antikörper wurde jedoch nur bei löslicher F_1-ATPase gefunden. Offensichtlich wird die inhibitorische Wirkung der ε Untereinheit auf die F_1-ATPase durch IgG- oder F_{ab}-Bindung aufgehoben.
Über die physiologische Bedeutung dieser Beobachtung kann hier nur spekuliert werden:
Möglicherweise ist die Inhibierung mit isolierter ε Untereinheit und die Stimulierung durch Anti ε IgG oder F_{ab} ein Prozeß, der erst durch das artifizielle Ablösen der F_1-ATPase von der Membran möglich wird und in vivo bei der Synthese der F_1-ATPase eine wichtige Rolle spielt: Durch Hemmung der ATPase-Aktivität von neusynthetisiertem Enzym im Cytoplasma durch die ε Untereinheit könnte der zelluläre ATP-Vorrat geschützt werden. Die Hemmung wird dann durch Bindung der F_1-ATPase an den F_o-Teil aufgehoben, was zur Stimulierung der Enzymaktivität führt. Ein solcher Mechanismus könnte durch Bindung von IgG oder F_{ab} an diese Untereinheit auch bei löslicher F_1-ATPase ausgelöst werden und würde die hier gefundenen Ergebnisse erklären. Unter diesen Voraussetzungen muß postuliert werden, daß bei der Isolierung der F_1-ATPase die ε Untereinheit möglicherweise durch Proteaseeinwirkung verändert oder teilweise abgebaut wird, so daß eine lösliche F_1-ATPase mit ATPase-Aktivität entstehen kann. Zugabe von isolierter ε Untereinheit könnte diese Veränderung wieder aufheben und so eine Enzymhemmung bewirken. Gestützt wird diese Hypothese durch Beobachtungen bei F_1-ATPasen von einigen Prokaryonten, bei denen nach Ablösen nur latente F_1-ATPasen gefunden wurden, die durch Proteasebehandlung aktiviert werden konnten (40).

3.2 Der F_0-Teil der ATP-Synthetase

Die drei bisher identifizierten Untereinheiten des F_0-Teils (a, b, c) müssen nach dem Modell der ATP-Synthetasen von Kagawa ([39]) zum einen den Protonenkanal durch die Membran bilden und zum anderen eine Bindestelle für die F_1-ATPase zur Verfügung stellen. Durch welche Organisation dieser Untereinheiten werden diese Funktionen erfüllt ?
Zur Beantwortung dieser Frage wurden bisher folgende Strategien angewandt:
Ausgehend von der Annahme, daß die c Untereinheit, das DCCD-bindende Protein, einen Protonenkanal bildet, wurde das isolierte Protein in Lipidvesikel eingebaut. Messung der Protonenpermeabilität solcher Vesikel ergab unterschiedliche Ergebnisse: Während bei den c Untereinheiten von Chloroplasten und Mitochondrien protonenleitende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten ([14],[53]), gelang dies nicht mit den DCCD-bindenden Proteinen von E.coli ([14], aber [3]) oder von dem thermophilen Bakterium PS 3 ([74]).
Die Proteine von thermophilen Bakterien zeichnen sich durch eine gegenüber Mesophilen erhöhte Anzahl von Salzbrücken aus ([39]). Solche Proteine sind deshalb stabiler und lassen sich in einigen Fällen auch in Gegenwart von Detergenzien in nativer Form isolieren. Der F_0-Teil des Thermophilen PS 3 konnte deshalb aus der Membran extrahiert, gereinigt und rekonstituiert werden ([73]). Diese Versuche ergaben, daß ein Komplex aus b und c Untereinheiten die beiden oben geforderten Funktionen des F_0-Teils erfüllen kann. Chemische Modifizierung der b Untereinheit verhinderte dabei die Bindung der F_1-ATPase an den F_0-Teil und zeigt, daß die b Untereinheit an der Bindung der F_1-ATPase beteiligt ist.
Aus diesem Versuch ergibt sich die Frage, ob die c Untereinheit den Protonenkanal alleine aufbauen kann, oder ob dafür zusätzlich die b Untereinheit notwendig ist.
Nachdem eine unc Mutante gefunden wurde (vgl. 2.2) bei der die b Untereinheit des F_0-Teils fehlt, war eine Beantwortung dieser Frage möglich: Messung der Protonenpermeabilität ergab, daß eine Protonenleitung durch den veränderten F_0-Teil der

Mutante nur in stark vermindertem Maße möglich ist. Da einerseits mit Antiseren gegen die F_1-Untereinheiten kein F_1-antigenes Material in solchen Membranvesikeln nachgewiesen werden konnte, andererseits auch gezeigt wurde, daß die c Untereinheit dieser Mutante gegenüber dem Wildtyp unverändert ist ([35]), liegt der Schluß nahe, daß die b Untereinheit am Aufbau des Protonenkanals beteiligt oder zum Aufbau notwendig ist.

Möglicherweise lassen sich die unterschiedlichen Ergebnisse der Rekonstitutionsversuche mit der c Untereinheit aus verschiedenen ATP-Synthetasen dadurch erklären, daß bei Chloroplasten und Mitochondrien ein protonenleitender Komplex bei der Isolierung der c Untereinheit erhalten bleibt, bei E.coli und PS 3 dagegen nicht. In diesem Fall kann ein solcher Komplex nur mit Hilfe der b Untereinheit aufgebaut werden.
Die Funktion der a Untereinheit im F_o-Teil ist noch weitgehend unklar. Da diese Untereinheit weder für einen funktionsfähigen Protonenkanal, noch für die Bindung von F_1-ATPase notwendig ist ([73]), spielt diese Untereinheit möglicherweise eine Rolle beim Zusammenbau des F_o-Teils.

3.3 Anordnung der unc Gene

Anwendung verschiedener immunchemischer Techniken ermöglichte einen einfachen Nachweis der ATP-Synthetase Untereinheiten im Wildtyp und in Mutanten. Mit Hilfe dieser Methoden gelang es, bei unc Mutanten mit einem Mu-Prophagen zwei Typen von Mutanten zu finden. Folgende Genanordnung liefert eine vernünftige Erklärung für die gefundenen Ergebnisse:

unc (c, a, δ) uncα unc (β, b)*

*Die Reihenfolge der Gene in runden Klammern ist beliebig.

Auf Grund einer Analyse von Mu-induzierten unc Mutanten mit Komplementationsversuchen in vivo schlugen Gibson et al. folgende Reihenfolge vor ([31]):

unc B E A {α} D {β} C

Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit erlaubt diese Methode keine Zuordnung von Gen und Genprodukt. Nachfolgende Charakterisierung von Mutanten des Phänotyps unc A und unc D ergab, daß diese Gene für die α und β Untereinheiten codieren ([16]).
Vergleich der beiden Genanordnungen zeigt, daß die Reihenfolge der Gene für die α und β Untereinheiten identisch ist. Ausgehend von diesem gemeinsamen Bezugspunkt, läßt sich darüber spekulieren, welche Genprodukte die Gene unc B und unc E codieren:
Charakterisierung von Punktmutanten des Phänotyps unc B und unc E ergab, daß solche Mutanten einen defekten F_0-Teil besitzen ([16]). Da von den F_0-Untereinheiten nur die beiden Polypeptidketten a und c vor unc α liegen, ist es plausibel, daß die beiden Gene unc B und unc E die a und c Untereinheiten codieren.
Punktmutanten des Phänotyps unc C sind dagegen nur wenig charakterisiert, so daß eine solche Zuordnung nicht möglich ist.

3.4 Biosynthese und Montage der ATP-Synthetase von E.coli

Bei der Biosynthese und der Montage der ATP-Synthetase müssen durch einen Regulationsmechanismus möglicherweise zwei Prozesse verhindert werden, die für die Zelle letal sind: a) die Bildung einer cytoplasmatischen F_1-ATPase, die durch nutzlose ATP-Hydrolyse den zellulären ATP-Vorrat verbraucht und b) die Entkopplung energieübertragender Prozesse durch den F_0-Teil, wenn keine F_1-ATPase gebunden ist.

Für den Zusammenbau der ATP-Synthetase von Chloroplasten wurde von Nelson et al. ([54]) ein Modell aufgestellt, das einen solchen Regulationsmechanismus berücksichtigt. Möglicherweise ist eine Regulation beim Zusammenbau dieser ATP-Synthetase dadurch gewährleistet, daß die δ und b Untereinheiten (bei diesem System mit Untereinheit II bezeichnet) im Cytoplasma synthetisiert werden und durch die Chloroplastenmembran transportiert werden müssen. In diesem Punkt unterscheidet sich dieses System von den ATP-Synthetasen aus Prokaryonten, bei denen der Zusammenbau des Enzyms möglicherweise durch die Reihenfolge der Gene für die Untereinheiten gesteuert wird. Dies wurde im folgenden Modell für die Montage der ATP-Synthetase von E.coli berücksichtigt. An Hand dieses Modells (Abb. 25) lassen sich einige der in dieser Arbeit gefundenen Phänomene interpretieren.

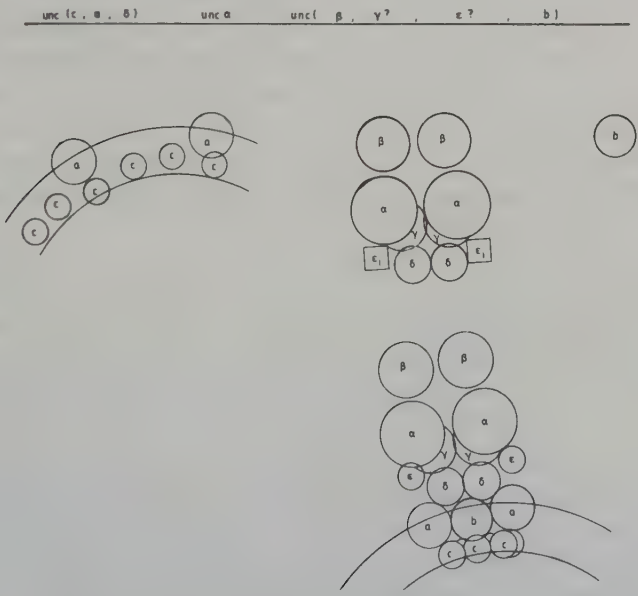

Abb. 25 Modell für die Biosynthese und die Montage der ATP-Synthetase von E.coli. (Mit einigen Änderungen übertragen von [54]).

Nach der hier postulierten Genanordnung startet die Biosynthese mit den Untereinheiten c und a. Die F_o-Untereinheiten werden in die Membran integriert und präformieren möglicherweise den F_o-Teil. Für den Aufbau eines Protonenkanals ist jedoch die b Untereinheit notwendig. Nach fortschreitender Biosynthese wird eine F_1-ATPase aufgebaut, die durch die ε Untereinheit (ε_i) gehemmt wird. Eine Bindung dieser F_1-ATPase an den präformierten F_o-Teil wäre dabei denkbar. Möglicherweise spielt die a Untereinheit dabei eine Rolle. Nach diesem Modell wird die b Untereinheit zuletzt synthetisiert. Durch einen hochkooperativen Prozeß, der aus den nachfolgenden drei Teilschritten besteht, wird eine vollständige und funktionsfähige ATP-Synthetase aufgebaut:

1) Aufbau des Protonenkanals
2) Bindung der F_1-ATPase an den F_o-Teil
3) Aufheben der inhibitorischen Wirkung der ε Untereinheit.

Evidenzen dafür, daß die b Untereinheit bei den beiden ersten Schritten (1 und 2) eine Rolle spielt, wurden gefunden (vgl. 2.3 und [73]). Ob die inhibitorische Wirkung der ε Untereinheit durch Bindung an den F_o-Teil oder an die b Untereinheit aufgehoben werden kann, ist dagegen unklar. Antikörperbindung an diese Untereinheit vermag einen solchen Prozeß auszulösen. Möglicherweise liegt ein gemeinsamer Mechanismus zu Grunde.

A b s t r a c t

BIENHAUS, GERHARD

IMMUNCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ATP-SYNTHETASE VON ESCHERICHIA COLI K 12

Nach Isolierung der F_1-Untereinheiten (α-ε) durch SDS-Gelelektrophorese in präparativem Maßstab wurden Antiseren gegen die F_1-Untereinheiten erhalten.
Anti γ IgG zeigte keine Präzipitation mit der nativen F_1-ATPase und mit einem Subkomplex aus je einer α, γ und ε Untereinheit. Nach Inkubation von F_1-ATPase mit IgG oder F_{ab} gegen die einzelnen F_1-Untereinheiten wurde im Falle der α und β Untereinheiten eine starke Hemmung (90 %), bei γ und δ wenig oder keine Änderung (80-100 %) und bei der ε Untereinheit eine Stimulierung (220 %) der Enzymaktivität gefunden.
Diese Stimulierung wurde nur im löslichen und nicht im membrangebundenen Zustand der F_1-ATPase beobachtet.
Mit einem Radioimmunoassay konnten in 80 Zellkolonien mit radiojodierten Anti α- und Anti β Antikörpern gleichzeitig nachgewiesen werden, ob diese Untereinheiten in Mu-induzierten unc Mutanten vorhanden sind oder nicht. Weiter werden Immun-Replika-Techniken beschrieben, die einen Nachweis der ATP-Synthetase Untereinheiten aus ganzen Zellextrakten ermöglichen. Mit Hilfe dieser Techniken wurden zwei verschiedene Klassen von unc Mutanten mit einem thermosensitiven Mu-Prophagen in der unc Region gefunden, die auf eine Genanordnung schließen lassen, nach der die F_1- und die F_o-Untereinheiten (a, b, c) in folgender Reihenfolge synthetisiert werden: (c , a, δ) α (β, b).
Die Protonenpermeabilität von F_1-ATPase freien Membranvesikeln der unc Mutante AS 12 war im Vergleich zum Wildtyp stark reduziert. Da diese Mutante einen veränderten F_o-Teil ohne die b Untereinheit besitzt, ist diese Untereinheit vermutlich am Aufbau des Protonenkanals beteiligt.

5 Material und Methoden

5.1 Abkürzungen

5.1.1 Genetische Symbole ([5])

ilv, *met*, *trp*	Auxotrophie für Isoleucin und Valin, Methionin
asn	und Tryptophan, sowie Asparagin
fad, *lac*	Unfähigkeit zum Abbau von Fettsäuren und Laktose
unc	Defekt in der ATP-Synthetase

5.1.2 Sonstige Abkürzungen

ACMA	9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin
BSA	Rinderserumalbumin
CM-	Carboxymethyl-
DE-	Diäthylaminoäthyl-
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
F_{ab}	Antigen bindendes Fragment (monovalenter Antikörper)
IgG	Immunglobulin G
MES	2-(N-morpholino)äthansulfonsäure
MOPS	2-(N-morpholino)propansulfonsäure
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PEG 6000	Polyäthylenglykol, Durchschnittsmolekular-
PEG 1550	gewicht 6000 bzw. 1550
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS, LiDS	Dodecylsulfat, Na bzw. Li Salz
TRIS	N-tris(hydroxymethyl)aminomethan

5.2 Bakterienstämme

Bezeichnung	Relevanter Genotyp	Herkunft
A 1	F^-, K 12 Y_{mel}, (λ), rha, fadR, but 12, lacI	Schairer (65,66,81)
BH 212, BH 526	A1, unc	Schairer
AS 11, 12, 69, 150	A1, ilv, metE, unc::Mu cts 62	Schairer
AS 12/25 12/1933	AS 12, nach Hitzeinduktion isoliert	Schairer
AS 69/1 69/0751	AS 69, nach Hitzeinduktion isoliert	Schairer

5.3 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders vermerkt, wurden sämtliche Chemikalien von der Firma Merck A.G., Darmstadt, sämtliche Enzyme und Coenzyme von Boehringer und Söhne, Mannheim , bezogen.

Bio Rad Laboratories, München	Agarose Bio-Gel P 6 Immobilisierte Lactoperoxidase Glucose Oxidase
Amersham, Braunschweig	$Na^{125}J$
Deutsche Bio Merieux, Nürtingen	Fluoreszein markierte Anti Kaninchen-IgG Antikörper
Difco Laboratories, Detroit	Casaminoacids
Bayer, Leverkusen	Trasylol
Fluka, Buchs	Äthanolamin, DCCD, Bromcyan

Pharmacia, Uppsala	Sepharose 4B, 6B Sephadex g 25
Sartorius, Göttingen	Zellulosenitratfolien Zelluloseacetatfolien
Serva, Heidelberg	Acrylamid reinst, Amidoschwarz 10 B Ammoniumpersulfat Coomassie Brillant Blue R 250 Glycin, Jodacetamid, Mercapto- äthanol, N,N' Methylenbisacrylamid N,N,N',N', Tetramethylendiamin, PEG 1550, 6000, SDS, LiDS, TRIS, Triton X-100
Eastman Kodak Company, Rochester	X Omat R Film XR 5
Sigma, München	MES,MOPS, BSA, Valinomycin
Whatmann, Maidstone	DE-52, CM-52
P. Friedl	Gefrorene Zellen von E.coli K 12 Anti a, b, c Antiseren Isolierte ATP-Synthetase
P. Overath	ACMA
G. Vogel	Anti F_1-ATPase Antiserum
H. Schwarz	Kaninchen Normalserum Anti Kaninchen-IgG Antiserum von der Ziege.

5.4 Nährmedien

Medium 1 (66)	50 ml 6 % Casaminoacids 10 ml 40 % Glucose 10 ml 1 % Isoleucin, Valin, Methionin 0,8 ml 1 M $MgSO_4$ mit CR-Puffer (11) auf 1 l auffüllen.
CR-Puffer	12 g K_2HPO_4 3 g KH_2PO_4 2 g $(NH_4)_2SO_4$ 1 ml Spurenelemente

Spurenelemente

480 mg $FeCl_3$ 6 H_2O
280 mg $MnCl_2$ 2 H_2O
360 mg $CaCl_2$ 2 H_2O
2 g ZnCl
290 mg H_3BO_3
190 mg $CoSO_4$ 7 H_2O
auf 1 l mit bidset. Wasser auffüllen.

5.5 Geräte

Aminco Ultrafltrationszellen, Modelle 12,52, 202
Aminco Bowmann Spektrophotofluorimeter
Beckmann Ultrazentrifugen 63-50, L5-65
Branson Sonifier B 12
Eppendorf Spektrophotometer
Eppendorf Tischzentrifuge 3200
Gilford Spektrophotometer 300-N, 240
Minicon A 25
Ribi-Cell Fractionator RF-1, Sorvall
Sorvall Superspeed Kühlzentrifuge RC2B
Flüssigkeits-Szintillationszähler Packard Tri-Carb 2425
UV-Transilluminator, Vetter

5.6 Messung der ATPase-Aktivität

Die ATPase-Aktivität der F_1-ATPase wurde in einem ATP-regenerierenden System optisch gemessen ([80]):
Die Standardtestlösung enthält:
50 mM TRIS/HCl pH 8,0
50 mM KCl
2,5 mM $MgCl_2$
5 mM ATP
1,5 mM PEP
0,2 mM NADH
6 E Pyruvatdehydrogenase (E.C.2.7.1.40)
6 E Lactatdehydrogenase (E.C.1.1.1.27)
1ml dieser Testllösung wird mit der Enzymlösung bei 25°C

inkubiert und die Oxidationsrate von NADH bei 334 nm optisch verfolgt.
Eine ATPase-Einheit ist definiert als diejenige Menge an Enzym, die 1 µM ATP pro Minute bei 25°C und bei pH 8,0 hydrolysiert.
Zur Messung der Enzymaktivität bei membrangebundener F_1-ATPase wird der atmungsabhängige NADH-Verbrauch durch Zugabe von 2 mM KCN inhibiert

5.7 Fluorimetrische Bestimmungen

5.7.1 ATP-abhängige Fluoreszenslöschung von ACMA in Membranvesikeln

Dieser Test charakterisiert die F_1-ATPase als Kopplungsfaktor und gibt ein relatives Maß für die energieübertragende Aktivität der ATP-Synthetase an ([66],[80]).
Die Standardtestlösung enthält:
50 mM MOPS/KOH pH 7,0
50 mM KCl
10 mM $MgCl_2$
2 µM ACMA
0,3-0,5 mg Membranvesikel mit gebundener F_1-ATPase
Die ATP-abhängige Fluoreszenslöschung von ACMA wird nach Zugabe von 2 mM ATP verfolgt (Anregungswellenlänge 410 nm, Emissionswellenlänge 490 nm).
Die Anfangsgeschwindigkeit der Fluoreszenslöschung ist ein relatives Maß für die energiübertragende Aktivität der ATP-Synthetase.

5.7.2 Messung der Protonenpermeabilität von Membranvesikeln ([56]).

Puffer:	A	50 mM MOPS/KOH pH 7,0	B	5 mM TRIS/HCl pH 8,0
		0,2 M KCl		10 Vol% Glycerin
		2,5 mM Mercaptoäthanol		2,5 mM $MgSO_4$
				2,5 mM Mercaptoäthanol

Zur Beladung mit Kaliumionen werden ATPase-frei Membranvesikel (3 mg Protein in 20 ml Puffer A kurz beschallt (2 x 2 sec; 50 W) und anschließend bei 4°C 1 h inkubiert. Nach Ultrazentrifugation (120 000g/90 min) wird die Membranfraktion isoliert und bei 0°C aufbewahrt.
Für einen Test werden einmal Membranvesikel (0,3 mg Protein) in 2 ml Puffer B suspendiert. Nach Zugabe von 2 µM ACMA und Start durch Valinomycin (20 ng) wird die Fluoreszenslöschung verfolgt. In einem zweiten Ansatz wird die Fluoreszenslöschung nach Inkubation gleicher Mengen Membranvesikel mit 200 µM DCCD (25 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur) analog gemessen. Die Differenz im Grade der Fluoreszenslöschung ist ein relatives Maß für die DCCD-sensitive Protonenpermeabilität von Membranvesikeln.

5.8 Isolierung der F_1-ATPase

Puffer:
C 50 mM MOPS/KOH pH 7,0
10 mM $MgCl_2$
C' wie Puffer C nur mit
10 µg/ml DNase 2000 E/mg
E 50 mM MOPS/KOH pH 7,0
20 Vol% Methanol
2,5 mM Mercaptoäthanol
D 2 mM TRIS/HCl pH 8,0
0,5mM EDTA
2,5mM Mercaptoäthanol
10 Vol% Glycerin

Die Isolierung der F_1-ATPase wurde in drei Schritten durchgeführt ([80]):

a) Zellaufschluß und Isolierung der Membranfraktion

200 g gefrorene Zellen von E.coli K12, gewachsen in Medium 1 und in der späten exponentiellen Phase geerntet, werden in 600 ml Puffer C' aufgetaut und in einer Ribi-Presse bei 20 000 psi bzw. bei unc Mutanten bei 15 000 psi aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer werden durch Zentrifugation bei 8 000 g/10 min abgetrennt. Membranvesikel isoliert man durch Ultrazentrifugation (120 000g 90 min), wäscht mit 280 ml Puffer D und zentrifugiert noch einmal wie oben.

b) Isolierung von ATPase-freien Membranvesikeln

Die Membranfraktion wird in 460 ml Puffer D aufgenommen. Unter diesen Bedingungen dissoziiert die F_1-ATPase vom F_o-Teil. Die ATPase-freien Membranvesikel werden durch Ultrazentrifugation (s.o.) abgetrennt und möglichst konzentriert in Puffer C aufgenommen.

c) Isolierung der F_1-ATPase

Der Überstand enthält den größten Teil der ursprünglichen ATPase-Aktivität. Man versetzt ihn mit Methanol im Volumenverhältnis 4:1 und stellt die Lösung auf 25 mM $MgCl_2$ ein. Der entstehende Niederschlag wird durch Zentrifugation (10 000 g/ 10 min) abgetrennt und der Überstand mit einer wässrigen Lösung von PEG 6000 (50 Gew.%) im Volumenverhältnis 4:1 versetzt. Nach Zentrifugation (s.o.) befindet sich der überwiegende Teil der ATPase-Aktivität im Niederschlag, der in 50 ml Puffer E aufgenommen wird. Die Lösung stellt man erneut auf 25 mM $MgCl_2$ ein, zentrifugiert den entstehenden Niederschlag ab und versetzt den klaren Überstand mit einer wässrigen Lösung von PEG 1550 (50 Gew.%). Das entstehende Präzipitat wird durch Zentrifugation abgetrennt, in 5 ml Puffer E aufgenommen und auf eine Sepharose 6B Säule (100 cm x 2,6 cm; äquilibriert mit Puffer E; Fließgeschwindigkeit 25 ml/h) aufgetragen. Enzymatisch aktive Fraktionen werden gesammelt und durch $MgCl_2$/PEG 6000-Fällung, wie zuvor beschrieben, konzentriert.

Ausgehend von 200 g Zellen betrug die Ausbeute etwa 25-35 mg F_1-ATPase mit einer spezifischen Aktivität von 40-50 E/mg Die Reinheit wurde jeweils durch analytische Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft.

5.9 Reversible Spaltung der F_1-ATPase und Isolierung von nativen Subkomplexen

Puffer: F 50 mM MES/KOH pH 6,1
4 mM ATP
1 M LiCl
G 20 mM Kaliumphosphat pH 6.5
2,5 mM ATP
2,5 mM Mercaptoäthanol
G' 50 mM Kaliumphophat pH 6,5
2,5 mM ATP
2,5 mM Mercaptoäthanol

Zur reversiblen Spaltung der F_1-ATPase ([80]) wird das Enzym (10 mg Protein) durch $MgCl_2$/PEG 6000-Fällung präzipitiert und in 1 ml Puffer F aufgenommen. Die Enzymlösung wird in einem Methanolbad bei -70°C eingefroren und auftauen lassen. Nach Entsalzen durch Sephadex G 25 Filtration bei 4°C (Sephadex g 25 Säule 4 cm x 0,5 cm; äquilibriert mit Puffer G) werden die Subkomplexe der F_1-ATPase durch Ionenaustauscherchromatographie an einer DE-52 Säule getrennt (DE-52 Säule 20 cm x 1 cm; äquilibriert mit Puffer G'; Elution mit einem linearen Gradienten (2 x 25 ml Volumen) von 50-300 mM Kaliumphsophat pH 6,5). Bei Ionenstärken von 70-80 mM Kaliumphosphat wurde Subkomplex I (α, γ, ε) und bei 150-200 mM Kaliumphosphat Subkomplex II (β) eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden in einer Minicon-A25-Zelle auf eine Proteinkonzentration von 1-2 mg/ml konzentriert.

5.10 Isolierung von F_1-ATPase-Untereinheiten durch SDS-Gelelektrophorese in präparativem Maßstab

3-10 mg der isolierten F_1-ATPase werden durch $MgCl_2$/PEG 6000-Fällung präzipitiert und in 0,5 ml Probenpuffer (Tab. 4) aufgenommen, der SDS enthält. Unter diesen Bedingungen dissoziiert die F_1-ATPase in ihre Untereinheiten, die sich durch Gelelektrophorese in präparativem Maßstab trennen lassen. Herstellung von Trenngel und Sammelgel wird in 5.13 beschrieben. Zur Elektrophorese legt man zunächst eine Spannung von 100 V für 3-5 h und anschließend für weitere 20-25 h eine Spannung von

200 V an. Die Proteinbanden werden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (10 min Färbelösung (Tab.4) und 3 h in Entfärbelösung (Tab. 4)). Die entsprechenden Gelsegmente werden ausgeschnitten, mit 5 ml Elektrophoresepuffer (Tab. 4) in einem Homogenisator zerkleinert und elektrophoretisch eluiert wie in Abb. 26 dargestellt.
Ausgehend von 3 mg F_1-ATPase war die Ausbeute an α und β Untereinheiten etwa 0,5 mg, die an γ, δ und ε Untereinheiten etwa 50-100 µg.

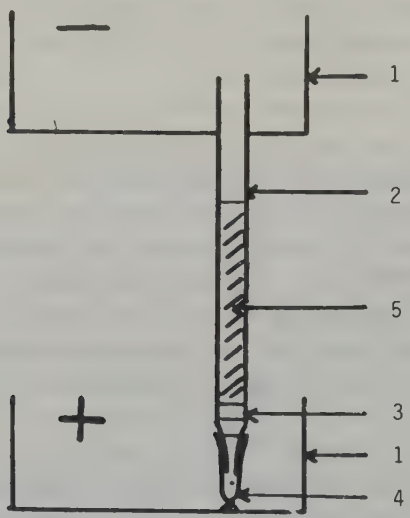

Abb. 26 Vorrichtung zur elektrophoretischen Elution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen.
1 Pufferreservoir, 2 Säule (20 cm x 1 cm) 3 Fritte 4 Dialyseschlauch, 5 homogenisiertes Polyacrylamidgel. Nach Anlegen einer Spannung von 200 V für 25-30 h waren die Proteine quantitativ eluiert.

5.11 Antikörper

5.11.1 Gewinnung von Antiseren

Um aus der Lösung von elektrophoretisch isolierten Untereinheiten freies SDS und Farbstoff abzutrennen, gibt man einen 3-4 fachen Oberschuß an sauerem Aceton (0,06 ml Essigsäure/ 100 ml Aceton) zu, trennt das ausgefallene Protein durch Zentrifugation (10 000 g/ 10 min) ab und suspendiert in 50 mM TRIS/Glycin pH 8,6. Die verschiedenen Proteinsuspensionen werden mit gleichem Volumen an kompletten Freund'schen Adjuvant (Difco-Laboratories) versetzt und duch Ultraschallbehandlung emulgiert.
Zur Erstimmunisierung wurden pro Kaninchen 0,2-0,5 mg Protein an mehreren Stellen der Kniefalten und der Axillarregionen subcutan, sowie in Vorder- und Hinterläufe intramuskulär injiziert.
Nach vier Wochen wurde mit 0,2-0,5 mg SDS-freiem Protein gebooster. Eine Woche danach wurde Blut aus der Ohrvene entnommen, etwa bei 4°C für 16 h inkubiert und nach Zentrifugation (500 g/20 min) wurden die Antiseren abgenommen.
Weitere Booster wurden in Abständen von sechs Monaten analog durchgeführt.

5.11.2 Isolierung von Immunglobulin G ([33])

IgG wird aus den Antiseren mit Ammoniumsulfat (45 % Sättigung) gefällt, in ihrem ursprünglichen Volumen mit 20 mM Kaliumphosphat pH 8,2 aufgenommen und gegen einen 100fachen Überschuß des gleichen Puffers 24 h dialysiert. Durch Ionenaustauscherchromatographie an einer DE-52 Säule (Säulenvolumen = ursprüngliches Serumvolumen; äquilibriert mit obigem Puffer) wird die IgG-Fraktion gereinigt. IgG bindet unter diesen Bedingungen nicht an das Säulenmaterial und erscheint im Ausschlußvolumen. Die IgG enthaltenden Fraktionen werden gesammelt und durch Ultrafiltration (PM-10) konzentriert. Die Ausbeute an IgG betrug 5-10 mg Protein pro ml Serum.

5.11.3 Papainspaltung von IgG und Isolierung von F_{ab} [62]

Puffer: H 0,1 M Natriumacetat pH 5,5 I 10 mM Natriumacetat pH 5,
10 mM Cystein
2 mM EDTA

Etwa 30-50 mg IgG wird in 3 ml Puffer H aufgenommen und mit 0,3-0,5 mg Papain (10 E/mg) bei 37°C für 16 h inkubiert. Durch Zugabe von 0,16 M Jodacetamid wird die Reaktion gestoppt, die Reaktionsmischung gegen 100fachen Überschuß an Puffer I 24 h dialysiert und auf eine CM-52 Säule aufgetragen (Säule 18 cm x 1,6 cm; äquilibriert mit Puffer I; Eluation mit einem linearen Gradienten von 0,1-0,5 M Natriumacetat pH 5,5, jeweils 160 ml). F_{ab}I, F_{ab}II und die F_c Fraktion wurde gesammelt [62] und durch Ultrafiltration konzentriert.

5.11.4 Isolierung von spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen F_1-Untereinheiten durch Immunadsorbenschromatographie an immobilisierter F_1-ATPase

5.11.4.1 Kopplung von F_1-ATPase an BrCN-aktivierte Sepharose

Herstellung von BrCN-aktivierter Sepharose 4 B [27]:

100 g Sepharose 4B wäscht man zunächst fünfmal mit je 1 l bidest. Wasser und nimmt die Sepharose zuletzt in 100 ml bidest. wasser auf.
Alle weiteren Handhabungen werden in einem gut ziehenden Abzug verrichtet. In einer tiefgekühlten Porzellanschale werden 16 gr BrCN (1/6 der eingesetzten Sepharosemenge) abgewogen, und zu der Sepharosesuspension unter Rühren (Magnetrührer) und Kühlung (Eisbad) zugegeben. Durch Zugabe von 2 M NaOH in 5 ml Portionen wird die Reaktion eingeleitet, wobei der pH-Wert der Lösung auf etwa 11 (Kontrolle durch pH-Meter oder Indikatorpapier) und die Temperatur unter 20°C gehalten werden. Notfalls können Eisstücke direkt zugegeben werden.
Nach etwa 20 min ist die Reaktion beendet. Nach Zugabe

100 g Eis wird die aktivierte Sepharose auf einer Nutsche abgetrennt, mit 1 l 0,1 M $NaHCO_3$ pH 8,0 gewaschen und sofort zu dem in demselben Puffer gelösten Protein gegeben (2 g BrCN-aktivierte Sepharose auf 10 mg Protein in 10 ml Puffer).

Kopplung von F_1-ATPase an BrCN-aktivierte Sepharose:

30 mg F_1-ATPase werden durch $MgCl_2$/PEG-Fällung präzipitiert, in 0,1 M $NaHCO_3$ pH 8,0 und 1% SDS gelöst und mit 6 g BrCN-aktiviertem Material suspendiert.
Die Reaktionsmischung wird 15 h bei 4°C unter Rühren inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml 1 M Äthanolamin pH 8,0 wird die verbleibende aktivierte Sepharose abgesättigt (Inkubationszeit 2 h bei Raumtemperatur).
Nach Filtrieren und Waschen mit 1 l Puffer wie oben, nimmt man das immobilisierte Material in 0,1 M Natriumborat pH 8,2; 1 M NaCl auf und gießt es in eine Säule, die zunächst mit dem gleichen Puffer und anschließend mit 4 M $MgCl_2$ Protein frei gewaschen wird.
Die Ausbeute an immobilisiertem Protein betrug 80-90 % der eingesetzten Proteinmenge.

5.11.4.2 Immunadsorbenschromatographie an immobilisierter F_1-ATPase ([27]).

Aus den Antiseren gegen die einzelnen F_1-Untereinheiten wurden die jeweils spezifischen Antikörper wie folgt isoliert: Nach Ammoniumsulfatfällung (45 % Sättigung) trennt man die IgG-Fraktion aus 20 ml Antiserum ab, nimmt in gleichem Volumen 0,1 M Natriumborat pH 8,2 ; 1 M NaCl auf und trägt es auf die zuvor beschriebene Säule mit immobilisierter F_1-ATPase auf (Säule 7 cm x 1 cm; äquilibriert mit obigem Puffer). Unspezifisch gebundenes Protein trennt man durch Eluation mit dem gleichen Puffer ab, während spezifische Antikörper mit 4 M $MgCl_2$ eluiert werden. Nach Dialyse zunächst gegen 100fachen Überschuß an bidest. Wasser (12 h), danach mit 20 mM Kaliumphosphat pH 8,2 , konzentriert man durch Ultrafiltration.

Mit Hilfe dieser Immunadsorbenschromatographie an immobilisierter F_1-ATPase lassen sich Antikörper spezifisch für jede der F_1-Untereinheiten aus den entsprechenden Antiseren gewinnen. Die Ausbeute betrug 0,5-1 mg/ml Antiserum.

5.11.5 Radiojodierung von IgG

Die Markierung von IgG mit ^{125}I wurde in einem gut ziehenden Abzug mit Bleiabschirmung in einem B-Labor durchgeführt.
Der Radiojodierungsansatz enthält ([8]):

50 µl 0,2 m Kaliumphosphat pH 7,2
10 µl IgG-Lösung (100-200 µg Protein)
50 µl Immobilisierte Lactoperoxidase Glucose Oxidase (mit 0,5 ml bidest. Wasser 1 h rehydratisiert).
5 µl $Na^{125}I$ 1 mCi, spezifische Aktivität 100 mCi/ml
25 µl 1 % β-D-Glucose

Nach einer Reaktionszeit von 15-20 min bei Raumtemperatur gibt man die Reaktionsmischung auf eine Bio-Gel P6 Säule (21 cm x 1 cm; äquilibriert mit 1 % BSA in PBS) und eluiert mit dem gleichen Puffer.
Die radiojodierten Antikörper werden unter diesen Bedingungen nicht zurückgehalten und erscheinen im Ausschlußvolumen.
Die gesammelten Fraktionen (ca. 10^5 cpm/ µl im ^3H-Kanal gezählt) wurden für weitere Versuche direkt eingesetzt.
Die Menge an proteingebundener Radioaktivität betrug etwa 40-50 % der eingesetzen Menge.

5.12 Immunchemische Methoden

5.12.1 Doppeldiffusionsexperimente

Immunodoppeldiffusionstests nach Ouchterlony ([58]) wurden in Immunodoppeldiffusionsplatten (10 mm Radius, 1mm Dicke) bestehend aus 1 % Agarose in 10 mM Kaliumphosphat pH 6,8 durchgeführt.

Das häufige Auftreten von artifiziellen Präzipitationsbanden bei Verwendung von SDS-haltigen Proben, konnte durch Zusatz von 1 % Triton X-100 verhindert werden. In diesem Fall wurden Doppeldiffusionsplatten aus 1 % Agarose in 50 mM TRIS/Glycin pH 8,6; 1 Vol% Triton X-100 benutzt.

5.12.2 Nachweis von ATP-Synthetase Untereinheiten in einzelnen Zellkolonien (^{34})

Zum Nachweis einzelner Untereinheiten in Zellkolonien mit radiojodierten Antikörpern, werden die Zellen zunächst von dem Agar-Nährboden auf ein Filterpapier übertragen, das zuvor in einem saueren Puffer (50 mM Glycin/HCl pH 2,8) inkubiert und getrocknet worden war.
Danach lysiert man die Zellen durch Eintauchen des Filterpapiers in Chloroformdampf (1 h), inkubiert anschließend mit Normalserum (1:1 verdünnt in PBS mit 1 % BSA) für 3 h vor und versetzt mit radiojodierten Antikörpern für weitere 12-16 h.
Nach Waschen (4 x 30 ml PBS; 2 x 30 ml 2 M NaCl in PBS) wird von dem Filterpapier eine Autoradiographie gemacht, wozu es auf einen für Röntgenstrahlen empfindlichen Film bei -30°C für 12-30 h gelegt wird.
Abschließend färbt man die Zellkolonien auf dem Filterpapier an durch Inkubation für 5 min in Färbelösung (0,5 mg/ml Coomassie Brillant Blue R 250 in 10 Vol% Essigsäure) und in Entfärbelösung (Methanol:Wasser:Essigsäure wie 45:45:10) für 5-6 h.

5.12.3 Immun-Replika-Techniken

Mit der Immun-Replika-Technik lassen sich Proteine nach elektrophoretischer Trennung in Polyacrylamidgelen durch Antikörperbindung nachweisen.

5.12.3.1 Zellextrakte für die Immun-Replika-Analyse

Puffer: J 0,1 M TRIS/HCl pH 8,0
10 mM EDTA
10 mM PMSF
1000 E Trasylol

Für den Nachweis der ATP-Synthetase Untereinheiten aus Zellextrakten werden exponentiell bei 32°C wachsende Zellen durch Zentrifugation (9 000g/10 min) geerntet, mit CR-Puffer (vgl. 5.4) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in Puffer J suspendiert (10 ml Puffer J / 1 g Zellen, Naßgewicht). Anschließend wird mit einem Beschallstab (50 W, 2 min in 15 sec Intervallen) unter Eiskühlung beschallt. Durch Zugabe von 2,5 Gew.% Li-DS und Inkubation (20 min) bei Raumtemperatur werden die Proteine denaturiert. Der Zellextrakt wird sofort auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen oder in fl. Stickstoff eingefroren.
Nach 5.8 isolierte Membranfraktionen werden analog mit Li-DS denaturiert.

5.12.3.2 Replika-Technik mit Agarose-Immuno-Gelen ([70])

Puffer: K 20 mM TRIS/Cl pH 7,4
150 mM NaCl
1 Vol% Triton X-100
K' wie Puffer K nur mit 2 Gew% $(NH_4)_2SO_4$

Zum Nachweis der ATP-Synthetase Untereinheiten in Polyacrylamidgelen wird das Gel nach Elektrophorese in einer feuchten Kammer auf ein Agarose-Immuno-Gel gelegt und 16 h inkubiert.
Für ein Agarose-Immuno-Gel (5cm x 4 cm x 0,1 cm = 2 ml Volumen) werden 15 mg IgG durch Ammoniumsulfatfällung präzipitiert und nach Zentrifugation (40 000g/ 10 min) in 0,5 ml Puffer K' aufgenommen. Die in diesem Puffer enthaltene Menge an Ammoniumsulfat begünstigt vermutlich die Präzipitation im Agarose-Immuno-Gel und

erbrachte gegenüber Immuno-Gelen ohne diesen Zusatz eine erhöhte Empfindlichkeit.
Durch Lösen von 15 g Agarose in 100 ml Puffer K unter Rückflußkochen (20 min) wird ein flüssiges Agarose-Gel hergestellt, das bei 45°C flüssig gehalten wird.
Dieses Agarose-Gel wird mit der auf 45°C erwärmten Antikörperlösung vermischt. Mit dieser Mischung gießt man nach dem üblichen Verfahren ein Flachbettgel, wobei Glasplatten und Pipetten zuvor ebenfalls auf 45°C erwärmt werden.

Nach Inkubation des Agarose-Polyacrylamid-"Sandwich" wird das Agarose-Immuno-Gel unter leichtem Schütteln und mehrmaligem Pufferwechsel zwei Tage bei 37°C mit Puffer K inkubiert.
Danach wird das Agarose-Gel entweder fixiert und angefärbt (vgl. unten) oder es wird mit Fluoreszein-markierten Anti Kaninchen-IgG Antikörper für 6-8 h inkubiert, weitere zwei Tage wie zuvor beschrieben mit Puffer K gewaschen und auf einer UV-Bank (UV-Transilluminator, Belichtungszeit etwa 1 min.) photographiert.
Durch Inkubation des Agarose-Immuno-Gels in einer Lösung aus 11,7 g Pikrinsäure in 833 ml dest. Wasser und 167 ml Essigsäure werden die Proteine nach (49) fixiert. Nach Waschen mit Äthanol und bidest. Wasser werden die Proteinbanden durch Amidoschwarzanfärbung (5 min in einer Anfärbelösung aus 1,25 g Amidoschwarz 10 B extra in 250 ml Entfärbelösung aus 2,5 ml Äthanol; 2,5 ml dest. Wasser und 495 ml Essigsäure; anschließend über Nacht in Entfärbelösung) sichtbar gemacht.
Abb. 27-29 zeigt die Anwendung dieser Technik zum Nachweis von F_1-Untereinheiten aus Zellextrakten, bzw. aus Immunfällungen. Ein Nachweis der F_o-Untereinheiten war mit dieser Methode nicht möglich.

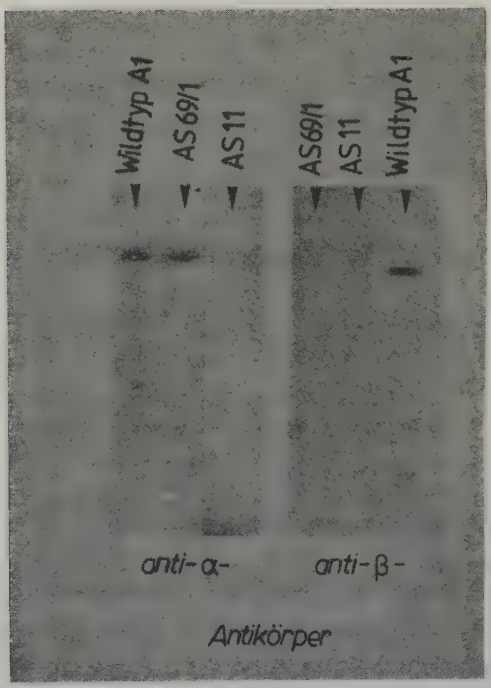

Abb. 27 Nachweis der α und β Untereinheiten aus verschiedenen Zellextrakten mit der Agarose-Immun-Replika-Technik.
Nach elektrophoretischer Trennung von Zellextrakten (30 µg) verschiedenen Mutanten und des Wildtyps in Polyacrylamidgradientengelen, wurden diese mit Agarose-Immuno-Gelen inkubiert, die Antikörper gegen die α und β Untereinheiten enthielten.

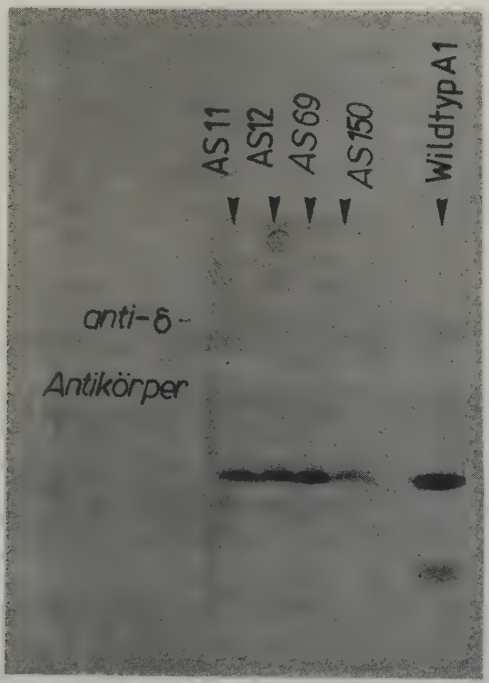

Abb. 28 Analyse von Immunpräzipitaten, die aus verschiedenen Zellextrakten mit Anti δ Antikörper präzipitiert wurden, mit Hilfe der Agarose-Immun-Replika-Technik. Zellextrakte (0,5 mg Protein) wurden mit je 200 µl Anti δ Antiserum 16 h bei 4°C inkubiert, die Immunpräzipitate durch Zentrifugieren (800 g/ 2min) abgetrennt und mit der Agarose-Immun-Replika-Technik analysiert.

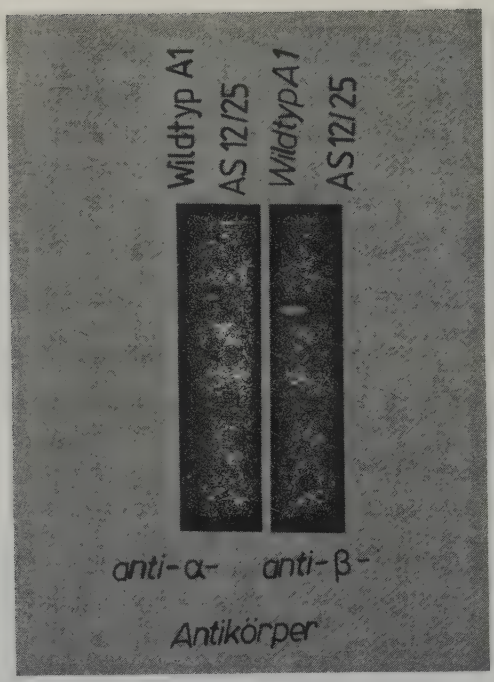

Abb. 29 Analyse von Immunpräzipitaten, die aus verschiedenen Zellextrakten mit Antiα- und Anti β - Antiserum präzipitiert wurden, mit Hilfe der Agarose-Immun-Replika-Technik.
Zellextrakte (0,5 mg Protein) wurden mit je 100 µl Antiserum 16 h bei 4^{o} inkubiert und weiter wie in Abb. 28 analysiert.
Statt Anfärben der Präzipitationsbanden wurden die Proteine mit Fluoreszein markierten Anti Kaninchen-IgG Antikörper sichtbar gemacht.

5.12.3.3 Immun-Replika-Technik mit Hilfe von Zellulosenitratfolien ([79])

An Stelle der Agarose-Immuno-Gele können zum Nachweis von ATP-Synthetase Untereinheiten auch Zellulosenitratfolien benutzt werden. Nach der Elektrophoreses legt man diese Folie auf das Acrylamidgel und überträgt die Proteine elektrophoretisch oder durch Diffusion mit dem aufsteigenden Pufferstrom . Dazu wird das Gel mit der Folie zusammen mit feuchten (bidest. Wasser) Filterpapieren zwischen zwei Plattenelektroden aus V2A-Stahl gelegt, an die eine Spannung von max. 30 V für 5-20 min angelegt wird (vgl. Abb. 30) Um die Proteine durch Diffusion mit dem aufsteigenden Pufferstrom zu eluieren, werden auf das Gel und die Folie trockene Filterpapiere gelegt, die aus einem Pufferreservoir Puffer nach oben durch das Gel saugen (vgl. Abb. 30). Nach Inkubation für 14 h werden vor allem Proteine mit geringem Molekulargewicht (15 000 - 8 500) quantitativ eluiert.

Die Folien werden anschließend 1 h in PBS mit 3 % BSA und 10 mM NaN_3 bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert, um unspezifische Adsorbtion von Antikörpern zu vermeiden. Danach inkubiert man mit dem gewünschten Antiserum (1:1 in obiger PBS-Lösung verdünnt) mindestens für 3 h bei Raumtemperatur. Nach Waschen der Folie mit 4 x 100 ml PBS und 1 x 100 ml 2 M NaCl in PBS können mit radiojodierten Anti Kaninchen-IgG Antikörper von der Ziege (1-3 10^6 cpm/ml im ^3H-Kanal gezählt) die gebundenen Antikörper autoradiographisch nachgewiesen werden, wobei unspezisch gebundene Antikörper durch Waschen mit 3 x 30 ml PBS; 1 x 30 ml 0,05 Vol% Triton X-100 in PBS; 1 x 30 ml 2 M NaCl in PBS zuvor entfernt werden. Die Folien werden zur Sicherheit in Plastikfolien eingeschweißt und auf einen für Röntgenstrahlen empfindlichen Film bei -30°C gelegt.

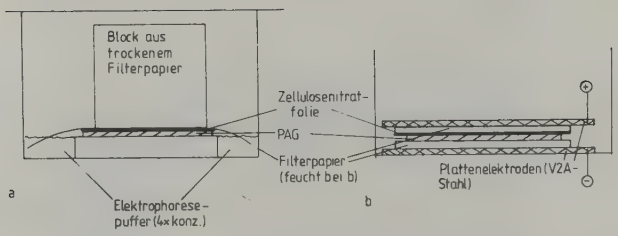

Abb. 30 Vorrichtungen zum Obertragen von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Zellulosenitratfolien.
a) Obertragen der Proteine durch Diffusion mit dem aufsteigenden Pufferstrom
b) Elektrophoretische Elution

5.13 Polyacrylamidgelelektrophorese

Polyacrylamidgelelektrophorese wurde in dem System von Laemli et al. (44) in einem Trenngel aus 14 % Acrylamid oder einem Acrylamidgradientengel von 7-20 % Acrylamid und einem Sammelgel (Tab. 4) durchgeführt.
Für präparative Zwecke wurden Polyacrylamidgradientengele (13 cm x 21 cm x 0,3 cm) durch Mischen von je 45 ml Lösung I und II (Tab.4) in einem Gradientenmischer verwendet.
Für analytsiche Zwecke wurden bei der Agarose-Immun-Replika-Technik Polyacrylamidgradientengele (14 cm x 13 cm x 0,13 cm; Mischen von je 6 ml Lösung I und II) und bei der Zellulosenitratfolien-Replika-Technik Gele (8 cm x 5 cm x 0,1 cm; Mischen von 4 ml Lösung II und 5 ml Lösung I) benutzt.

Tab. 4 Lösungen für die Polyacrylamidgelelektrophorese

	14 %iges Trenngel	Gradientengel 7-14 % Lösung I	Lösung II	Sammelgel
30 % Acrylamid; 0,8 % N,N' Methylenbisacrylamid (Bis)	18,5 ml	15 ml	-	2,5 ml
4 x Trenngelpuffer	10 ml	15 ml	-	-
40 % Acrylamid; 0,4 % Bis; 20 % Saccharose	-	-	31 ml	-
4 x Trenngelpuffer; 20 % Saccharose	-	-	16 ml	-
4 x Sammelgelpuffer	-	-	-	2,5 ml
Dest. Wasser	11 ml	15 ml	19 ml	5 ml
10 % Ammoniumpersulfat	0,2 ml	125 µl	50 µl	30 µl
N,N,N',N' Tetramethylendiamin	30 µl	52 µl	52 µl	10 µl

4 x Trenngelpuffer : 1,5 M TRIS/HCl pH 8,8; 0,4 % SDS

4 x Sammelgelpuffer : 0,5 M TRIS/HCl pH 6,8; 0,4 % SDS

Probenpuffer : 50 mM TRIS/HCl pH 8,6; 0,1 % SDS; 2 % Mercaptoäthanol; 2 % Glycerin

Elektrophoresepuffer : 25 mM TRIS/Glycin pH 8,6; 0,1 % SDS

Färbelösung : 0,25 % Coomassie Brillant Blue R 250; 20 % Methanol; 10 % Essigsäure; 30 % dest. Wasser.

Entfärbelösung : 7 % Methanol; 5 % Essigsäure; 88 % Wasser

Durch Inkubation der Gele in Färbelösung (Tab. 4) für 20-30 min und in Entfärbelösung (Tab. 4) für 14 h, jeweils bei 60°C, werden die Proteinbanden sichtbar gemacht.

5.14 Proteinbestimmung ([33],[64])

Etwa 1-20 µg Protein in 1-5 µl Lösung werden auf einen Zelluloseacetatstreifen aufgetragen. Nach vollständigem Eintrocknen der Lösung färbt man die Proteine mit Amidoschwarz an (0,25 Gew.% Amidoschwarz 10 B extra; 45 Vol.% Methanol; 10 Vol.% Essigsäure; 45 Vol.% dest. Wasser; Inkubation 3-5 min; entfärben mit 5 x 100 ml Entfärbelösung aus 90 Vol.% Methanol; 2 Vol.% Essigsäure; 8 Vol.% dest. Wasser). Die Proteinflecken werden mit einem Korkbohrer ausgestanzt (ϕ 8-10 mm), der Farbstoff wird mit 1 ml (2 ml bei Proteinmengen von 10-20 µg) Eluationslösung (25 mM NaOH; 0,05 mM EDTA; 50 Vol.% Äthanol) eluiert und die optische Dichte bei 630 nm bestimmt.
Als Referenz wurden BSA-Lösungen mit bekanntem Proteingehalt benutzt.
Bei dieser Proteinbestimmungsmethode wirkt SDS in Konzentrationen bis zu 2 % nicht störend.

Der Proteingehalt von Immunglobulin G-Lösungen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 278 nm bestimmt. (OD_{278} = 1,5 ≙ 1 mg/ml Protein).

6 Literaturverzeichnis

1) Altendorf,K., Harold,F.M., Simoni,R.D. (1974) J.Biol.Chem. 249, 4587-4593
2) Altendorf,K., Zitzmann,W. (1975) FEBS-Lett. 59, 268-272
3) Altendorf,K. (1977) FEBS-Lett. 73, 271-275
4) Arnon,R. (1973) in "The Antigens", Vol. 1 , Sela,M. Ed., Academic Press, New York und London, S. 88- 157
5) Bachmann,B.J., Brooks Low,K., Taylor,A.L. (1976) Bacteriol.Rev. 40, 116
6) Bragg,P.D., Hou,C. (1972) FEBS-Lett. 28, 309-312
7) Bragg,P.D., Hou,C. (1980) Eur.J.Biochem. 106, 495-503
8) Bio-Rad Laboratories Product Information 1060 E (1978)
9) Bukhari,A.I. (1974) J.Mol.Biol. 96, 87-99
10) Butlin,J.D., Cox,G.B., Gibson,F. (1971) Biochem.J. 124, 75-81
11) Cohen,G.N., Rickenberg,H.W. (1956) Ann.Inst.Pasteur (Paris), 91, 693-698
12) Cox,G.B., Crane,F.L.,Downie,J.A., Radik,J. (1977) Biochem.Biophys.Acta 462, 113-120
13) Cox,G.B., Downie,J.A., Gibson,F., Radik,J. (1977) Biochem.J 170, 593-598
14) Criddle,R.S., Packer,L., Shieh,P. (1977) Proc.Natl. Acad.Sci. USA 74, 4306-4310
15) Crumpton,M. J. (1974), in "The Antigens", Vol.2, Sela,M. Ed.,Academic Press New York und London, S, 1-78
16) Downie,J.A., Gibson,F.,Cox,G.B. (1979) Ann.Rev. Biochem. 48, 103 - 131
17) Downie,J.A., Senior,A.E., Gibson,F., Cox,G.B. (1979) J.Bacteriol. 137, 711-718
18) Dunn,S.D. (1978) Biochem.Biophys.Res.Commun. 82, 596-602
19) Dunn,S.D., Futai,M. (1980) J.Biol.Chem. 255, 113-118
20) Faelen,M., Toussaint,A. (1978) J.Bacteriol. 136, 477-483
21) Fayle,D.R., Downie,J.A., Cox,G.B., Gibson,F., Radik,J. (1978) Biochem.J. 172, 523-531

22) Fillingame,R.H. (1975) J. Bacteriol. 124, 870-883
23) Foster,D.L., Fillingame,R.H. (1979) J.Biol.Chem. 254 8230-8236
24) Friedl.P. (1979) Dissertation, Universität Tübingen
25) Friedl.P., Friedl,C., Schairer,H.U. (1979) Eur.J.Biochem. 100, 175-180
26) Friedl.P., pers. Mitteilung
27) Fuchs,S., Sela,M, (1973) in "Handbook of Experimental Immunology" Vol.1, 2nd. ed., Weir,D.M.,Ed; Oxford Blackwell Scientific, 11.1-11.4
28) Futai,M., Sternweis,P.C., Heppel,L.A. (1974) Proc.Natl. Acad.Sci. USA 71, 2725-2729
29) Gibson,F., Cox,G.B., Downie,J.A., Radik,J. (1976) Biochem.J. 162, 665-670.
30) Gibson,F., Cox,G.B., Downie,J.A., Radik,J.,(1976) Biochem.J. 164, 193-198
31) Gibson,F., Downie,J.A., Cox,G.B., Radik,J. (1978) J.Bacteriol. 134, 728-735
32) Harold,F.M. (1972) Bact.Rev. 36, 172-230
33) Heide,K., Schwig,H.G.,; Fahey,J.L., Terry,E.W. (1973) in"Handbook of Experimental Immunology" Vol.1, 2nd ed., Weir,D.M.,Ed., Oxford, Blackwell Scientific, 6.1-7.16
33) Heil,A., Zillig,W., (1970) FEBS-Lett. 11, 165-168
34) Henning,U., Schwarz,H.,Chen,R. (1979) Anal.Bioch. 97 153-157
35) Hoppe,J., pers. Mitteilung
36) Horstman,L.L., Racker,E. (1969) J.Biol.Chem. 245, 1336-1344
37) Howe,M.M., Bade,E.G. (1975) Science 190, 624-632
38) Kagawa,Y., Sone,N., Yoshida,M., Hirata,H., Okamoto,H., (1976) J.Biochem. 80, 141-151
39) Kagawa,Y. (1978) Biochim.Biophys.Acta 505, 45-93
40) Kalra,V., Lee,S.H., Ritz,C.J., Brodie,A.F., (1975) J.Supramol Struct. 3 231-241
41) Kanazawa,H., Saito,S., Futai,M. (1978) J.Biochem. 84, 1513-1517
42) Kanner,B.I., Nelson,N., Gutnick,D.L. (1975) Biochim. Biophys. Acta 396, 347-359

43) Konings,W.N., Kaback,H.R. (1973) Proc.Natl.Acad.Sci USA, 70 3376-3381
44) Laemli,U.K., Fabre,M. (1973) J.Mol. Biol. 80, 575-599
45) Laget,P.P., Smith,J.B., (1979) Arch.Biochem.Biophys. 197, 83-89
46) Larson,J.L., Smith,J.B., (1977) Biochemistry 16, 4266-4270
47) Lunardi,J., Satre,M.,Bof,M., Vignais,P.V. (1979) Biochemistry 18, 5310-5316
48) Mitchell,P. (1967) Fed.Proc. 26, 1370-1379
49) Miyake,J., Fehrnström,H.,Wallenborg,B., (1977) LKB-Application Note 310
50) Nelson,N., Kanner,B.I., Gutnick,D.L. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci.USA 71, 2720-2724
51) Nelson,N., Nelson,H., Racker,E., (1972) J.Biol.Chem. 247, 7657-7662
52) Nelson,N., Deters,D.W., Nelson,H., Racker,E.,(1972) J.Biol.Chem. 248, 2049-2055
53) Nelson,N., Eytan,E., Sigrist,H.,Sigrist-Nelson,K., Gittler,C., (1977) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 74 2375-2378
54) Nelson,N., Nelson,H., Schatz,G. (1980) Proc.Nat.Acad. Sci. USA 77, 1361-1364
55) Nieuwenhius,F.J., Kanner,B.I., Gutnick,D.L., Postma,P.W., van Dam,K. (1973) Biochim,Biophys.Acta 325, 62-71
56) Okamoto,H., Sone,N., Hirata,H., Yoshida,M.,Kagawa,Y., (1977) J.Biol.Chem. 252, 6125-6131
57) Oppenheim,J.D., Nachbar,M.S., (1978) in "Immunochemistry of Enzymes and Their Antibodies" , Salton,M.R.J.,Ed. John Wiley & Sons, New York, S. 89-124
58) Ouchterlony,Ö., Nilson,L.Å., (1973) in "Handbook of Experimental Immunology", Vol. 1, 2 nd. ed., Weir,D.M., Ed., Oxford, Blackwell Scientific, 19.1-19.39
59) Pedersen,P.L., (1974) Bioenergetics 6, 243-275
60) Penefsky,H.S., (1974) in "Enzymes" 3rd Vol.X 375-395
61) Pick,U., Racker,E. (1978) J.Biol.Chem. 254, 2793-2799
62) Porter,R.R., (1959) Biochem.J. 73, 119-126
63) Rosen,B.P., (1973) J.Bacteriol. 116, 1124-1129
64) Schaffner,W., Weizmann,C.,(1973), Anal.Biochem. 56, 502-514

65) Schairer,H.U., Haddock,B.A. (1972) Biochem.Biophys. Res.Commun. 48, 544-551

66) Schairer,H.U., Friedl,P., Schmid,B.,Vogel,G. (1976) Eur.J.Biochem. 66, 257-268

67) Sebald,W., Hoppe,J., Wachter,E. (1979) in "Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport" Quagliariello,E. et al. eds., Elsevier/North-Holl., Amsterdam, S. 63-74

68) Sebald,W. (1977) Biochim.Biophys.Acta 463,1-27

69) Senior,A.E., Downie,J.A., Cox,G.B., Gibson,F., Langman,L., Fayle,D.R.H. (1979) Biochem.J 180, 103-118

70) Showe,M.K., Isobe,E., Onorato,L., (1976) J.Mol. Biol. 107, 55-69

71) Smith,J.B., Sternweis,P.C. (1977) Biochemistry 16, 306-311

72) Smith,J.B., Sternweis,P.C.,Heppel,L.A. (1975) J.Supramolec. Struct. 3, 248-255

73) Sone,N., Yoshida,M., Hirata,H., Kagawa,Y. (1978) Proc. Nat.Acad.Sci. USA 75, 4219-4223

74) Sone,N., Yoshida,M., Hirata,H., Kagawa,Y., (1979) J.Biochem 85, 503-509

75) Starlinger,P. (1977) Ann.Rev.Genet. 11, 103-126

76) Sternweis,P.C. (1977) J.Biol.Chem. 253, 3123-3128

77) Sternweis,P.C., Smith,J.B. (1977) Biochemistry 16 4020-4025

78) Sternweis,P.C., Smith,J.B. (1980) Biochemistry 19, 526-531

79) Towbin,H., Staehelin,T., Gordon,J. (1979) Proc.Nat. Acad.Sci.USA 76, 4350-4354

80) Vogel,G., Steinhart,R. (1976) Biochemistry 15, 208-216

81) Vogel,G., Steinhart,R. (1978) Eur.J.Biochem. 87, 155-160

82) Würzburg,U. (1978) Kontakte 10 3/78

83) Yoshida,M., Okamoto,H., Sone,N., Hirata,H., Kagawa,Y., (1976) Proc.Nat.Acad.Sci.USA 74, 936-940

84) Yoshida,M., Sone,N., Hirata,H., Kagawa,Y., Ui,N., (1979) J.Biol.Chem. 254, 9525-9533

85) Yoshida,M., Sone,N., Hirata,H.,Kagawa,Y. (1977) J.Biol.Chem. 252, 3480-3485

Lebenslauf

Geburtsdatum	6. März 1953
Geburtsort	Weinheim an der Bergstraße
Eltern	Reinhard Bienhaus Obering. Marianne Bienhaus geb. Funder
Schulausbildung	1960 - 1964 Friedrichschule Weinheim 1964 - 1972 Gymnasium Weinheim 16. 6. 1972 Abitur
Studium	WS 1972/73 Studium der Chemie an der TU Berlin SS 1974 Fortsetzung des Chemiestudiums an der TH Darmstadt 9. 6. 1978 Erlangung des Grades "Diplom-Ingenieur" Juni 1978 - Juni 1980 Anfertigung der Dissertation mit dem Thema "Immunchemische Charakterisierung der ATP-Synthetase von Escherichia coli K 12" am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen unter Anleitung von Dr. G. Vogel und Prof. Dr. P. Overath.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Damen und Herren Professoren und Dozenten:

in Berlin

Anorganische Chemie	:	Sarry, Schumann
Analytische Chemie	:	Schulze

in Darmstadt

Anorganische Chemie	:	Grobe, Schäfer
Physikalische Chemie	:	Weil, Wölfel, Homann, Eichenauer
Technische Chemie	:	Luft, Fetting
Organische Chemie	:	Hafner, Kreher, Habermehl, Lichtenthaler
Biochemie	:	Gassen